



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**O DENTE COMO MÉTODO ORGÂNICO DE CULTURA IN SITU
DE ODONTOBLASTOS: AVALIAÇÃO HISTOMORFOLÓGICA**

Trabalho submetido por
João Tiago da Silva Botelho
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Junho de 2015



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

O DENTE COMO MÉTODO ORGÂNICO DE CULTURA IN SITU DE ODONTOBLASTOS: AVALIAÇÃO HISTOMORFOLÓGICA

Trabalho submetido por
João Tiago da Silva Botelho
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Maria Alzira Cavacas

Junho de 2015

Dedicatória

Aos meus pais, Gina e Vitor

À minha irmã, Mariana

À mulher da minha vida, Vanessa

“O único lugar onde sucesso vem antes do trabalho é no dicionário”

Albert Einstein

Agradecimentos

À Prof. Doutora Maria Alzira Cavacas, agradeço a orientação durante todo este trabalho. Fez elevar os meus conhecimentos científicos e humanos. O rigor, o trabalho, a vontade de crescer e aprender, e o sentido de responsabilidade consigo aprendidos levo para toda a vida. Obrigado pela amizade, frontalidade, sinceridade e pelos conselhos ternos desde a primeira hora.

Ao Gonçalo Borrecho, agradeço a ajuda preciosa e criteriosa na preparação das amostras histológicas. A arte e o talento que são necessários para cumprir este papel mostram o brilhantismo com que tu o desempenhas. Obrigado pela tua amizade, disponibilidade e, as sempre presentes, palavras animadoras.

Ao Professor Doutor José Martins dos Santos, pela preciosa ajuda e disponibilidade de me permitir desenvolver este projecto no seu laboratório, bem como o conselho de ser a professora Alzira a me guiar neste projecto.

Ao Prof. Doutor Paulo Maia e aos professores Nuno Silva, Helena Costa e Ana Rita Pereira, que por integrarem o curso de sisos inclusos, tiveram um papel preponderante na recolha do material necessário para que este projecto fosse possível. Agradeço também o apoio e paciência em todos os momentos.

Ao Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz por estes 5 anos de intensa aprendizagem, quer a nível profissional quer a nível pessoal. Muito do que sou hoje como futuro médico-dentista devo ao seu brilhante corpo docente, que tudo faz para que evoluamos, e sejamos melhores a cada dia.

Aos meus pais, Gina e Vitor. As palavras são poucas para expressar o meu agradecimento. Vocês são a minha inspiração e os meu ídolos. Lutam todos os dias para que tenhamos um futuro melhor. Obrigado pelo apoio e amor incondicional.

À minha Irmã, Mariana. Obrigado pelo teu apoio, amizade e amor. Obrigado por me fazeres lembrar todos os dias da importância de sorrir e de quão bonita foi a minha infância.

À mulher da minha vida, Vanessa. Sem ti este projecto não era possível. Apoiaste-me nos momentos bons e menos bons. Esta etapa já está concretizada e agora falta o resto das nossas vidas.

A todos os meus amigos, a todos os meus colegas e professores, que todos os dias enaltecem a importância da amizade, da humildade, da partilha e da ajuda mútua.

Resumo

Introdução: O estudo e compreensão do complexo pulpo-dentinário são dificultados pela particularidade deste tecido estar envolvido por tecidos mineralizados. Atualmente, a escassez de métodos de cultura de odontoblastos primários torna-se uma barreira para entendermos com certeza as respostas celulares observadas já que os estudos *in vitro* não conseguem recriar a complexidade da biologia *in vivo*. Desta forma, torna-se importante testar novos métodos de cultura que nos aproximem cada vez mais do estudo humano *in vivo*.

Objectivos: Avaliar histomorfologicamente se o dente, suplementado com soro de cultura celular e incubado em estufa controlada, é um método de cultura orgânico *in situ* de odontoblastos viável.

Materiais e Métodos: Trinta terceiros molares foram cortados longitudinalmente na junção amelocementária e divididos aleatoriamente em 6 grupos: controlo positivo; controlo negativo Soro Fisiológico (durante 11 dias); controlo negativo Sem Meio (durante 3 dias); +1 dia, +4 dias e +7 dias em estufa com soro de cultura, respetivamente. Procedeu-se à descalcificação das peças para observação em microscópio óptico e descrição da histomorfologia.

Resultados: Em comparação com o controlo positivo, os complexos pulpo-dentinários observados nos grupos +1, +4 e +7 dias evidenciaram uma arquitetura pulpar condizente com uma polpa normal, em oposição aos resultados dos grupos de controlo negativo. Verificou-se a presença de pré-dentina, característica inerente a odontoblastos funcionais, e uma camada odontoblástica característica. Observaram-se em poucas peças algumas alterações relacionadas com o método de preparação.

Conclusões: O dente, suplementado com soro de cultura celular e incubado em estufa controlada, pode ser um método orgânico promissor de cultura *in situ* de odontoblastos. É necessária uma otimização do corte e do procedimento de descalcificação para se obter uma homogeneização dos resultados histológicos em estudos futuros.

Palavras-chave: odontoblastos, polpa, cultura *in situ*, células humanas primárias.

Abstract

Introduction: The study and understanding of the dentin-pulp complex are hampered by the circumstance of this soft tissue is surrounded by mineralized tissues. Currently, the scarcity of primary odontoblast culture methods becomes a barrier to the understanding of the cell responses observed since *in vitro* studies can't recreate the complexity of *in vivo* biology. Therefore, it becomes important to test new methods of culture that bring us closer human *in vivo* study.

Aims: Histomorphology assessment of the tooth, supplemented with a cell culture serum in a controlled incubator, is a viable *in situ* odontoblasts organic culture method.

Material and Methods: Thirty third molars were cut along the cemento-enamel junction and randomly distributed into 6 groups: positive control; negative control saline (for 11 days); negative control without serum (for 3 days); +1 day, +4 days and +7 days in an incubator with culture serum, respectively. Then, the teeth were decalcified and prepared for histological assessment in light microscopy.

Results: In comparison to the positive control group, dentin-pulp complexes observed in groups +1, +4 and +7 days showed a pulp architecture consistent with a normal pulp, as opposed to the results of negative control groups. We noticed the presence of pre-dentine, inherent characteristic of functional odontoblasts, and a typical odontoblast layer. We observed, in a few pieces, some amendments related to the preparation method.

Conclusions: The tooth, supplemented with a cell culture serum in a controlled incubator, may be a promising *in situ* odontoblasts organic culture method. It's necessary a cut and decalcification optimizations in order to obtain homogeneous histologic results in future research.

Key words: odontoblasts, pulp, *in situ* culture, primary human cells.

Índice

I. Introdução.....	15
1. O Dente	15
1.1 Esmalte	16
1.2 Dentina.....	17
1.3 Polpa	20
1.4.1 Odontoblasto	25
1.4.2 A dinâmica do complexo pulpo-dentinário.....	30
1.4.2.1 Envelhecimento do complexo pulpo-dentinário	30
1.4.2.2 Consequências da lesão de cárie no complexo pulpo-dentinário.....	32
1.4.2.3 O efeito da preparação cavitária no complexo pulpo-dentinário	34
1.4.2.4 O efeito das técnicas de adesão no complexo pulpo-dentinário	37
1.4.2.5 O desgaste dentário e o complexo pulpo-dentinário.....	37
II. Objectivos e Hipóteses	39
III. Material e Métodos	40
Critérios	41
Protocolo Experimental.....	41
Protocolo de Descalcificação	43
Microscopia Óptica	44
Análise Estatística	44
IV. Resultados.....	46
1. Caracterização da amostra.....	47
1.1 Posição na arcada.....	47
1.2 Quanto ao género.....	47
1.3 Quanto à rizogénese.....	47
2. Análise Histomorfológica	48
2.1 Testes-piloto de descalcificação	48

2.2 Grupos	49
2.2.1 Grupo 0 (Controlo Positivo)	49
2.2.2 Grupo SF (Controlo Negativo)	50
2.2.3 Grupo SM (Controlo Negativo)	51
2.2.4 Grupo +1 dia	52
2.2.5 Grupo +4 dias.....	53
2.2.6 Grupo +7 dias.....	54
V. Discussão	55
Análise da metodologia empregue	55
Análise histomorfológica	58
VI. Conclusões.....	59
VII. Referências Bibliográficas	61
VIII. Anexos	

Índice de Figuras

Figura 1 – Estrias de Retzius e <i>Perikymatas</i>	17
Figura 2 – Figura representativa das várias zonas distintas da polpa	21
Figura 3 – Algumas células pulpareas	22
Figura 4 – Inervação sensorial pelas fibras A e fibras C	24
Figura 5 – Imagem representativa da diferenciação odontoblástica.....	26
Figura 6 – Imagem representativa do ciclo de vida do odontoblasto	27
Figura 7 – Microscopia Electrónica de Transmissão de alta ampliação do cílio primário	28
Figura 8 – Características histomorfológicas de odontoblastos, células subodontoblásticas e fibroblastos pulpareas com o envelhecimento	31
Figura 9 – Resposta e alterações ultraestruturais da camada odontoblástica e capilares subodontoblásticos após a preparação cavitária de molares de rato	35
Figura 10 – Odontoblastos associados a áreas de dentinogénese reacional e áreas de dentina adjacente	36
Figura 11 – Resposta pulpar 48 horas após <i>ethanol-wet bonding</i> e <i>water-wet bonding</i>	37
Figura 12 – F.E.S.E.M. do teto da câmara pulpar de um animal exposto ao ruído	38
Figura 13 – Amostras em formol (10%) num Falcon® 50ml.....	44
Figura 14 – Placa de 24 poços, com algumas amostras submergidas em soro DMEM.	44
Figura 15 – Dente colocado num dos poços da placa, submergido em soro DMEM.....	45
Figura 16 – Dente durante o processo de descalcificação	45
Figura 17 – Fotomicrografias de dentes descalcificados em ácido nítrico	48
Figura 18 – Fotomicrografias óptica de corte transversal de dente do grupo 0.....	49
Figura 19 – Macrofotografia de um dente do grupo SF	50
Figura 20 – Fotomicrografias de dente do grupo SF	50
Figura 21 – Macrofotografia de dente do grupo SM	51
Figura 22 – Fotomicrografias de dente do grupo SM.....	51
Figura 23 – Fotomicrografias de dente do grupo +1 dia	52
Figura 24 – Fotomicrografias de dente do grupo +4 dias	53
Figura 25 – Fotomicrografia de dente do grupo +7 dias	54

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Funções das junções celulares presentes nos odontoblastos	29
Tabela 2 – Constituintes e Suplementos do soro DMEM (1000 ml)	43
Tabela 3 – Posição na arcada dos dentes utilizados no estudo	47
Tabela 4 – Género do paciente.....	47
Tabela 5 – Rizogénese das peças dentárias.....	47

I. Introdução

1. O Dente

Os dentes são órgãos calcificados, implantados nos alvéolos maxilares e mandibulares.

Desempenham um papel crucial na saúde e vida social de cada um de nós. Apesar da sua principal função ser a mastigação, também são essenciais na fonação e deglutição, bem como na estética e harmonia facial e bucal.

Do ponto de vista anatómico, qualquer dente apresenta uma coroa (porção exposta na cavidade oral) e raízes (porção que penetra o osso alveolar). A união entre ambas dá-se pelo colo dentário (Ferraris & Muñoz, 2006).

Na espécie humana, a dentição decídua abrange 20 dentes. Cada hemiarcada contém 2 incisivos, 1 canino e 2 molares. A dentição definitiva inclui 32 dentes, em que cada hemiarcada possui 2 incisivos, 1 canino, 2 pré-molares e 3 molares (Avery & Chiego, 2006).

Tomando em consideração a forma e função, os incisivos possuem bordos afiados em bisel, com o desígnio de cortar alimentos; os caninos, que têm uma forma cônica que serve para rasgar os alimentos; e os pré-molares e molares, que apresentam superfícies aplanadas que ajudam a triturar e moer os distintos alimentos (Ferraris & Muñoz, 2006).

Os dentes podem ser monorradiculares, com apenas uma raiz, como os incisivos e caninos, ou multirradiculares, múltiplas raízes, como os pré-molares e molares (Kumar, 2011).

O dente propriamente dito consiste em esmalte, que é um tecido duro, inerte e acelular, com origem epitelial, e suportado pela dentina, que é um tecido conjuntivo laxo, menos mineralizado, mais resiliente e vital (Nanci, 2012). Estes dois tecidos cobrem e protegem a polpa dentária, rica em tecido conjuntivo, vasos e nervos.

Os dentes estão implantados nos ossos maxilares pelos tecidos de suporte: cemento, ligamento periodontal e osso alveolar (Nanci, 2012).

1.1 Esmalte

O esmalte é o tecido mais duro do nosso corpo e cobre a coroa do dente, conferindo-lhe forma e contorno (Avery & Chiego, 2006). É o único tecido dentário com origem ectodérmica.

O esmalte é constituído por 96% do seu peso em material inorgânico (principalmente fosfato de cálcio sob a forma de cristais de hidroxiapatite), 1% em material orgânico e 3% de água (Kumar, 2011).

O esmalte é translúcido, e varia de cor amarelada a branco-acinzentado. A sua espessura varia de um máximo de 2,5 mm em superfícies de trabalho até uma fina camada na região cervical (Nanci, 2012).

O esmalte presente na coroa totalmente formada não apresenta células viáveis, vasos e nervos. Os ameloblastos – células formadoras de esmalte – degeneram assim que a formação de esmalte termina (Kumar, 2011). Portanto, o esmalte está completamente formado antes da erupção.

O esmalte é o único tecido do nosso organismo que não apresenta colagénio na sua matriz orgânica. Esta matriz é constituída por proteínas não-colagénicas, sendo 90% amelogeninas (grupo de proteínas de baixo peso molecular) e os restantes 10% são não-amelogeninas, onde se evidenciam a enamulina e a ameloblastina (Kumar, 2011; Nanci, 2012).

O esmalte é depositado a uma velocidade de 4 µm por dia, no sentido centrífugo. Tais incrementos são identificáveis como: as estrias de Retzius (Fig. 1), que representam o padrão incremental de esmalte e a dinâmica de posicionamento celular; as bandas de Hunter-Schreger, que patenteiam as mudanças de direção dos prismas de esmalte, e que se exibem como estrias escuras e claras, de profundidades variáveis. Estas linhas de crescimento manifestam-se na superfície do esmalte como cristas, conhecidas por *perikymatas* (Fig. 1) (Avery & Chiego, 2006; Kumar, 2011).

A dureza do esmalte torna-o também muito quebradiço. Deste modo, a dentina, pela sua resiliência e flexibilidade, mantém a integridade do esmalte. Por isso, na ausência de dentina, devido a cárie ou preparo cavitário inapropriado, o esmalte fratura facilmente (Nanci, 2012).

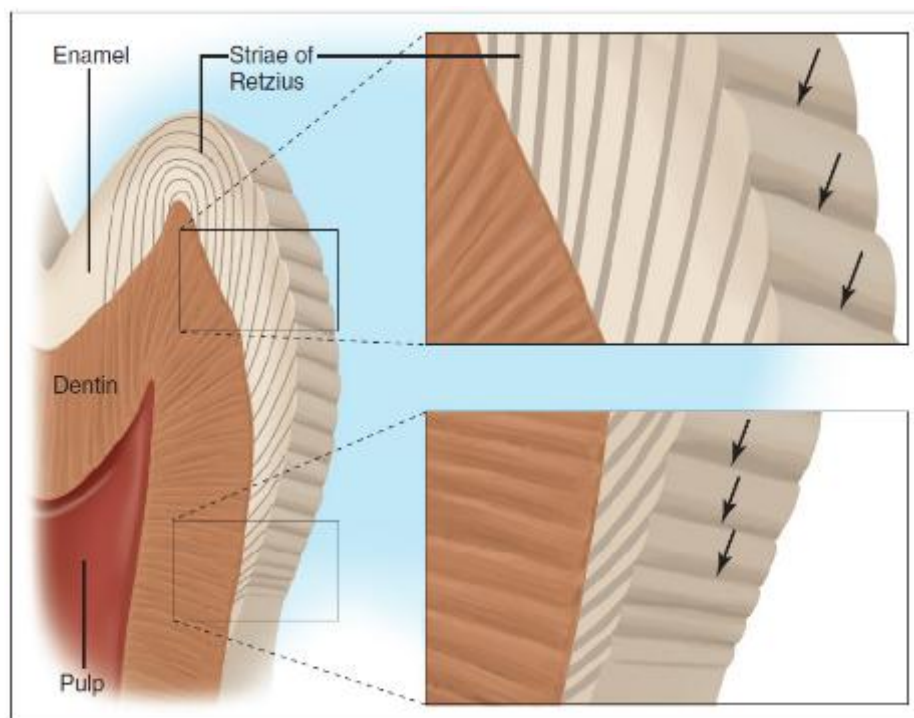


Figura 1 – Estrias de Retzius e *Perikymatas*. Imagem que representa a disposição das estrias de Retzius e sua manifestação à superfície do esmalte, como *perikymatas* (setas). À esquerda vemos um corte vertical com os constituintes dentários. À direita observamos que as estrias de Retzius vão, gradualmente, desaparecendo em direção a cervical. Adaptado de Nanci (2012).

1.2 Dentina

A dentina é o tecido conjuntivo mineralizado em maior quantidade no dente (Linde e Goldberg, 1993) e forma a sua principal massa/volume (Nanci, 2012). Como afirma Ørvig (1967 como citado em Linde & Goldberg, 1993), a dentina é, filogeneticamente, uma derivação do tecido ósseo.

Desde que começa a sua formação, previamente ao esmalte, a dentina determina a forma da coroa, bem como o número e o tamanho das raízes (Kumar, 2011).

Como afirma Cavacas (2014), a dentina é “recoberta pelo esmalte na porção coronária e pelo cimento na porção radicular. A dentina aloja no seu interior tecido conjuntivo não mineralizado, a polpa dentária”.

A dentina apresenta uma cor branco-amarelada e contribui para a cor do dente devido à translucidez do esmalte (Cavacas, 2014).

A dentina é uma matriz muito similar ao osso, que se caracteriza por inúmeros túbulos dentinários que atravessam toda a sua espessura e que contêm no seu interior prolongamentos

odontoblásticos, responsáveis pela formação e manutenção da dentina (Arana-Chavez & Massa, 2004; Nanci, 2012).

Ao contrário do esmalte, a dentina é viscoelástica e sujeita a deformação ligeira (Kumar, 2011).

Relativamente às características químicas da dentina madura, esta é composta por aproximadamente 70% de matéria inorgânica, 20% matéria orgânica e 10% água (Linde & Goldberg, 1993; Avery & Chiego, 2006; Nanci, 2012).

A componente inorgânica consiste em hidroxiapatite por substituição. A fase orgânica compreende 90% de colagénio, maioritariamente tipo I e uma pequena quantidade de tipo V, com a inclusão de proteínas não-colagénicas. Estas proteínas não-colagénicas, como afirma Nanci (2012), “preenchem o espaço entre as fibras de colagénio e acumulam-se ao longo da periferia dos túbulos dentinários, regulando a deposição mineral e podendo atuar como inibidores”. As matrizes proteicas da dentina e do osso são muito semelhantes, mas destacam-se as fosfoproteínas e sialoproteínas dentinárias por serem exclusivas da dentina (Kumar, 2011).

Entre a camada odontoblástica e a dentina mineralizada encontramos uma fina camada de 10-50 µm de matriz não-mineralizada (Linde & Goldberg, 1993; Nanci, 2012), a pré-dentina, que é semelhante ao osteóide.

Presentemente, conhecem-se 3 tipos principais de dentina: primária, secundária e terciária.

A **dentina primária** constitui a maior parte do volume de dentina. Dentro desta, podemos distinguir: a dentina do manto, que é a primeira camada de dentina a ser formada e que se situa próximo da junção amelodentinária; e a dentina circumpulpar, que constitui o resto da dentina primária e que também pode ser dividida em dentina intertubular e dentina peritubular (Linde e Goldberg, 1993). A dentina primária caracteriza-se por ter um padrão regular e estrutura tubular (Smith *et al.*, 1995).

A **dentina secundária** representa a função secretora pós-desenvolvimento dos odontoblastos primários, após a formação da raiz estar completa. É elaborada ao longo das paredes de dentina circumpulpare durante o tempo de vida dos odontoblastos (Tziafas, 1995; Murray *et al.*, 2000). A dentina secundária pode ser distinguida, histologicamente, da primária por uma linha de demarcação subtil, uma diferença na coloração e menor organização dos túbulos dentinários (Nanci, 2012). Paralelamente, a dentina secundária difere da primária por ser menos tubular (Smith *et al.*, 1995).

A **dentina terciária** (de substituição, reparadora ou neodentina) é uma dentina com um padrão muito irregular, que é produzida com o intuito de se criar uma barreira protetora entre a polpa e o estímulo lesivo (Murray *et al.*, 2000). Dentro desta podemos distinguir: dentina reacional, produzida por odontoblastos primários que sobreviveram a um estímulo nocivo; e dentina reparadora, produzida por uma nova geração de *odontoblast like-cells* (células indiferenciadas da polpa) como resposta a um estímulo nocivo externo, após a morte dos odontoblastos primários. A estrutura da dentina terciária é muito variável e pode ir desde uma estrutura tubular regular (indistinguível das dentinas primária e secundária) a uma matriz atubular distrófica com células aprisionadas no seu interior (Smith *et al.*, 1995; Cavacas *et al.*, 2013; Cavacas, 2014).

Como exemplo de estímulos nocivos, que podem desencadear um processo de dentinogénese terciária, temos lesões de cárie, atrito, abrasão, erosão, trauma, preparações cavitárias em tratamentos dentários e microinfiltrações marginais das restaurações (Murray *et al.*, 2000; Nanci, 2012; Cavacas *et al.*, 2013). No entanto, como afirma (Murray *et al.*, 2000) “em muitos casos, o desafio mais severo para a sobrevivência dos odontoblastos não é o resultado direto destes acidentes ou estímulos ambientais, mas a técnica cirúrgica e os materiais utilizados para restaurar a estrutura dentária após estes incidentes”.

Podemos também referir dentina esclerótica, embora esta seja, à semelhança da dentina terciária, um mecanismo de defesa. Igualmente conhecida como dentina transparente, notória pela completa obliteração dos túbulos dentinários, é um substrato alterado fisiológica e patologicamente como resposta a estímulos como atrito, abrasão, fratura e cárie. O facto da permeabilidade deste tipo de dentina ser nula à superfície e ser muito reduzida na sua camada mais interna, faz com que esta seja uma barreira protetora para o complexo pulpo-dentinário em situação de injúria (Tay & Pashley, 2004; Cavacas *et al.*, 2013).

Podemos observar na dentina, as linhas incrementais de von Ebner, linhas incrementais perpendiculares ao longo eixo dos túbulos dentinários (Cavacas, 2014) e que refletem as mudanças cíclicas da orientação das fibras de colagénio (Nanci, 2012). Outro tipo de padrão incremental são as linhas de contorno de Owen, que segundo Cavacas (2014) “são o resultado de distúrbios ou alterações metabólicas que ocorrem durante a dentinogénese”.

A dentina é innervada por terminações nervosas oriundas da polpa, e que acompanham, segundo (Kumar, 2011), entre 30 a 70% o trajeto dos prolongamentos odontoblásticos ao longo do túbulo dentinário, pelo que a innervação do complexo pulpo-dentinário será abordado à frente.

1.3 Polpa

A polpa e a dentina integram o complexo pulpo-dentinário, uma unidade biológica e estrutural (Carda & Peydró, 2006). Estão relacionadas embriológica, histológica e funcionalmente (Nanci, 2012).

A polpa ocupa a região central do dente e consiste em tecido conjuntivo laxo que suporta a dentina. Está acomodada na coroa (na câmara pulpar), e nas raízes (nos canais radiculares). Desta forma, a polpa presente na coroa chama-se polpa coronária, e a polpa presente na raiz chama-se polpa radicular (Kumar, 2011; Nanci, 2012). A conformação pulpar reflete a anatomia da coroa do dente. É importante referir os cornos pulpares, que de acordo com Cavacas (2014) “são protrusões que acompanham as cúspides dos dentes”, dependendo o número de cornos pulpares do número de cúspides presentes no dente.

Quando observada histologicamente, podemos distinguir 4 zonas na polpa (Fig. 2): a zona odontoblástica na periferia da polpa; a zona acelular ou camada basal de Weil, abaixo dos odontoblastos e que é proeminente na polpa coronária; a zona rica em células, onde temos uma grande população celular, facilmente observável na polpa coronária; e o núcleo pulpar ou região central, rica em vasos e troncos nervosos (Nanci, 2012). Estes vasos e troncos nervosos penetram a polpa através do canal apical e prosseguem até à câmara pulpar.

A zona basal de Weil é uma camada subodontoblástica pobre em células com cerca de 40 µm de espessura. Geralmente, é bem definida na zona coronária e ausente na região radicular. Nela podemos observar o plexo nervoso de Raschkow, o plexo capilar subodontoblástico (constituído por células subodontoblásticas de Höhl), os fibroblastos subodontoblásticos (que contactam com os odontoblastos e células de Höhl através de *gap junctions*) e as células dendríticas pulpares. É composta por fibras delicadas e é um espaço onde os odontoblastos se movem para protecção pulpar durante o desenvolvimento do dente e, mais tarde, de uma forma limitada. É uma região quase impercetível na fase inicial de dentinogénese, possivelmente devido à migração maciça de odontoblastos que se sucede (Avery & Chiego, 2006; Ferraris & Muñoz, 2006; Kumar, 2011).

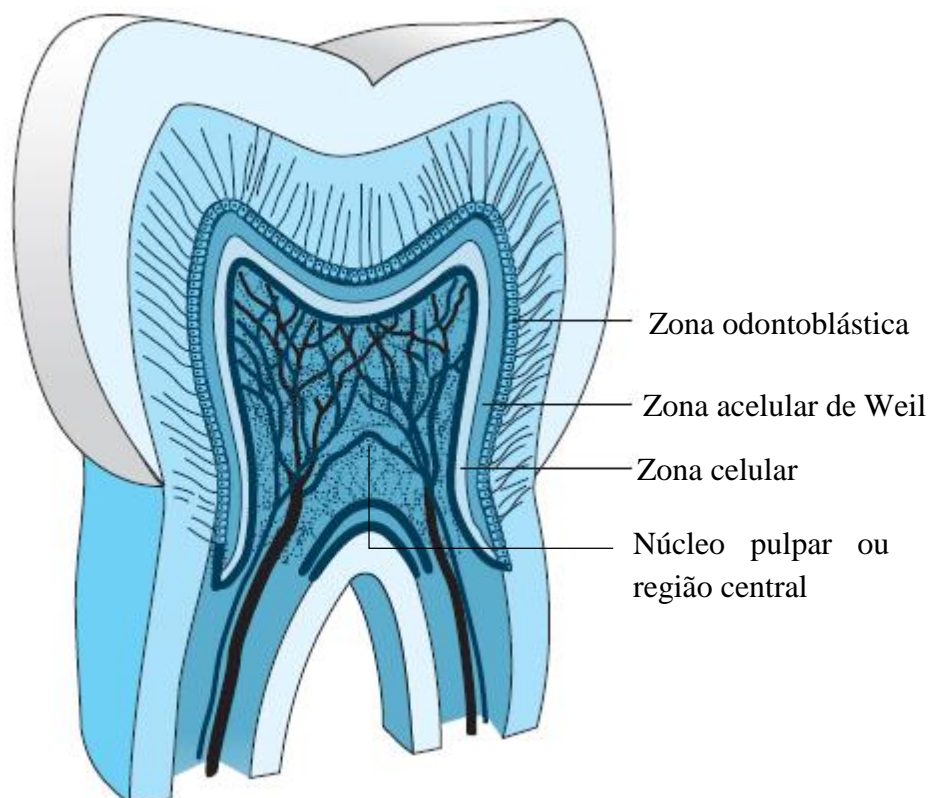


Figura 2 – Figura representativa das várias zonas distintas da polpa. Adaptado de Kumar (2011).

Considerando a zona rica em células, esta caracteriza-se pela elevada densidade celular, vasos e nervos (Avery & Chiego, 2006). Os elementos celulares predominantes da polpa são: os fibroblastos, os odontoblastos, as células mesenquimatosas indiferenciadas, as células inflamatórias e as células pulpares estaminais (Jontell, Okiji, Dahlgren, & Bergenholtz, 1998; Kumar, 2011; Nanci, 2012).

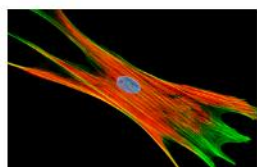
Os fibroblastos são as células mais abundantes da polpa, com uma forma estrelada típica e extensos prolongamentos. Formam a matriz colagénica e participam no ciclo de *turn-over* do colagénio (onde ingerem e degradam as fibras envelhecidas) (Kumar, 2011). Encontram-se numa substância intercelular rica em glicosaminoglicanos e fibras de colagénio (Avery & Chiego, 2006).

Os odontoblastos são o segundo tipo celular mais profuso da polpa. Pela sua importância para o presente estudo serão descritos detalhadamente adiante.

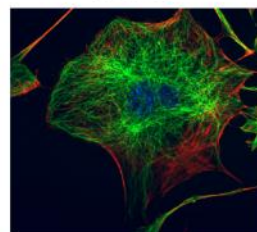
As células mesenquimatosas indiferenciadas são células primárias da polpa jovem e que são escassas em polpas de dentes totalmente formados. São células com uma aparência maior que os fibroblastos, têm um formato poliédrico com prolongamentos periféricos e um grande

núcleo oval (Kumar, 2011; Nanci, 2012). Em polpas envelhecidas o seu número diminui, e segundo, Kumar (2011) “acredita-se que são células totipotentes que, quando necessário, se podem tornar odontoblastos, fibroblastos ou macrófagos”. Estas células de aspeto fusiforme apresentam um comportamento distinto ao repousarem sobre os capilares, funcionando como células de reserva.

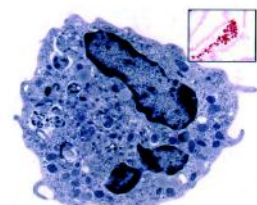
Elementos celulares



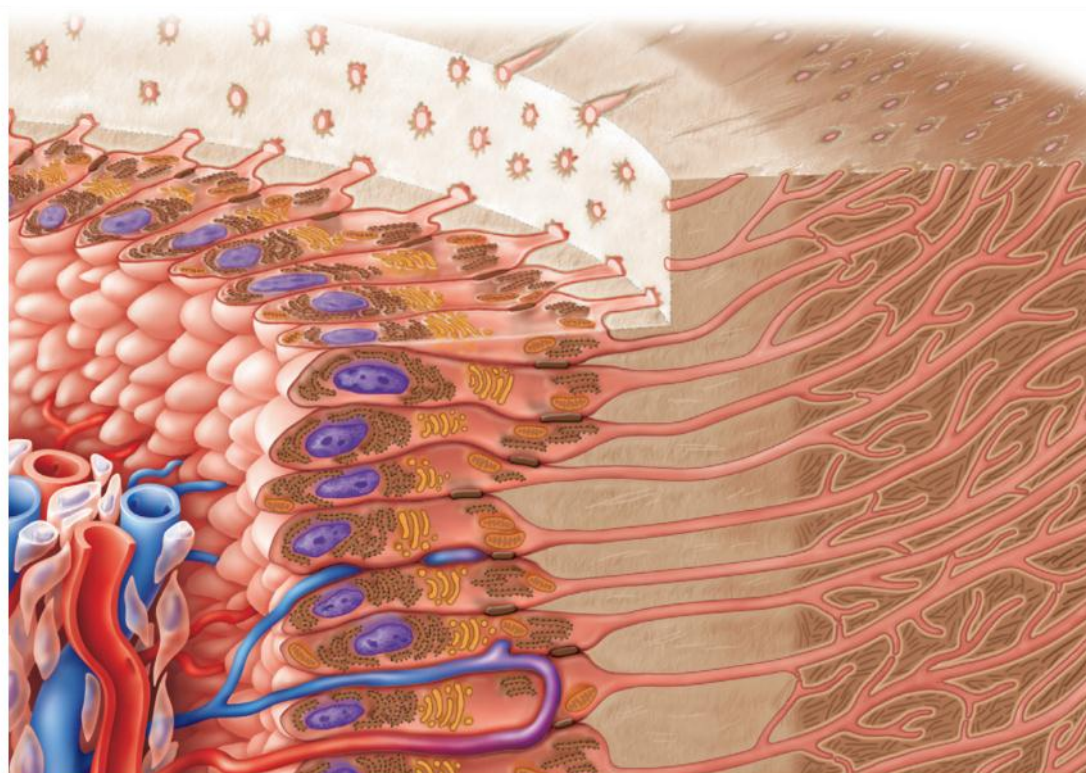
Fibroblasto



Célula Mesenquimal Indiferenciada



Macrófago



Camada odontoblástica

Figura 3 – Figura representativa de algumas células pulpaes presentes. À esquerda, imagens de microscopia electrónica de fibroblasto e célula mesenquimatosa indiferenciada, e imagem de macrófago. À direita, imagem da camada odontoblástica, camada acelular e camada celular. Adaptado de Nanci (2012).

Relativamente às células inflamatórias, podemos descrever principalmente: os macrófagos ou histiócitos, que estão dispersos por toda a polpa e envolvidos na eliminação de células mortas como fibroblastos; células dendríticas, que desempenham um papel de imunovigilância em situações de lesão de cárie, atrição ou procedimentos restauradores; linfócitos T, escassos linfócitos B e eosinófilos; plasmócitos, apenas presentes em inflamações pulpaes; e mastócitos, presentes tanto em polpas normais como em polpas inflamadas (Jontell *et al.*, 1998; Hargreaves & Cohen, 2011; Kumar, 2011; Nanci, 2012).

No que concerne às células pulpares estaminais, são células pluripotentes com capacidade de auto-renovação e, de acordo com Nanci (2012), “sob condições apropriadas podem diferenciar-se em odontoblastos, osteoblastos, condrócitos, adipócitos ou neurónios”. Perante a morte de odontoblastos primários, estas células migram para o local da agressão e produzem dentina (Kumar, 2011).

Na polpa, a envolver todas as células, subsiste uma matriz extracelular rica em colagénio de tipo I e tipo III. A envolver estas fibras está a substância fundamental pulpar (Avery & Chiego, 2006).

A polpa é um tecido amplamente vascularizado. Pelo forâmen apical entram arteríolas que se ramificam à medida que penetram a polpa, originando capilares que se vão localizar na área subodontoblástica. A circulação eferente da polpa é garantida por um extenso sistema de vénulas de diâmetro semelhante às arteríolas. Podemos ainda encontrar anastomoses arteriovenosas que representam a comunicação entre o sistema de arteríolas com o sistema de vénulas pulpares (Kumar, 2011; Nanci, 2012).

A circulação linfática também está presente na polpa e cumpre uma função essencial de manter o equilíbrio do fluido intersticial no tecido pulpar. Atualmente, sabemos que a polpa apresenta uma ramificação linfática que culmina com um ou dois vasos linfáticos de maior calibre, que deixam o dente pelo foramen apical (Nanci, 2012). Considerando a investigação de Oehmke, Knolle e Oehmke (2003), “a linfa, na região coronal, é recolhida em fendas no tecido intersticial e drenada no sentido apical, onde será transportada via capilares linfáticos”.

À semelhança de todas as células do nosso corpo, as células pulpares estão dependentes do fluido extracelular para se manterem vitais e funcionais, ou seja, do plasma sanguíneo e do fluido intersticial. Os capilares estão tão amplamente distribuídos que nenhuma célula está a mais de 50-100 micras de distância do sistema circulatório. Assim, o fluido intersticial providencia um meio de comunicação das células com o sangue, como extensão do plasma (Heyeraas & Berggreen, 1999).

O complexo pulpo-dentinário é altamente innervado por uma imensa quantidade de neurónios, e segundo Hargreaves e Cohen (2011) “inclui neurónios aferentes, que conduzem os impulsos nervosos, e neurónio eferentes, que providenciam modulações neurogénicas da microcirculação e reações inflamatórias”. Os nervos seguem o mesmo percurso que os vasos e ramificam-se à medida que chegam ao centro pulpar, comportando-se da mesma forma que o sistema vascular.

A inervação sensorial pulpo-dentinária (aférente) é assegurada por nervos que nascem no gânglio trigeminal e possui 2 tipos de nervos sensoriais: mielinizados (fibras A) e não-mielinizados (fibras C) (Fig. 4). As fibras A (A-beta e A-delta) são fibras que se localizam na periferia da polpa e que inervam os túbulos dentinários; são estimuladas pelo movimento do fluido dentinário; 90% das fibras são do tipo A-delta; a dor associada caracteriza-se por ser dor aguda e em picada. As fibras C são fibras que se localizam na porção profunda da polpa propriamente dita e caracterizam uma dor do tipo queimadura e menos suportável que a sentida pelas fibras A-delta (Hargreaves & Cohen, 2011).

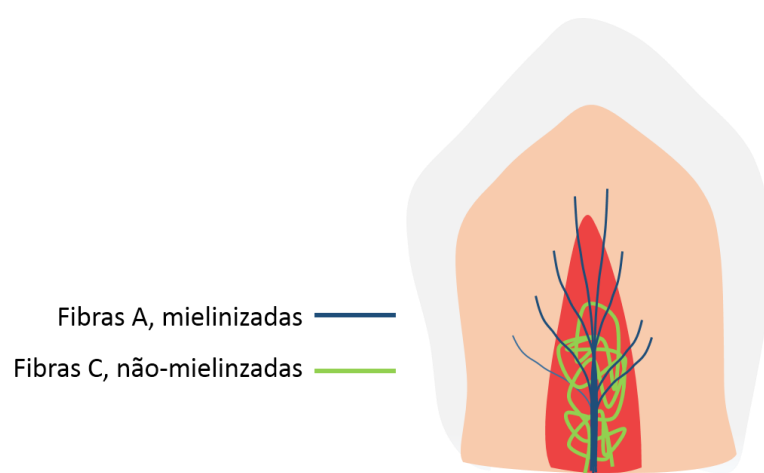


Figura 4 – Figura representativa da inervação sensorial pelas fibras A e fibras C. As fibras A localizam-se na periferia da polpa e as fibras C localizam-se, preferencialmente, na porção profunda da polpa. Adaptado de Hargreaves & Cohen (2011).

A inervação simpática dos dentes deriva do gânglio cervical superior (Hargreaves & Cohen, 2011). Os nervos simpáticos pós-ganglionares inervam os dentes e estruturas de suporte via nervos maxilar e mandibular, ramos do trigêmeo (Rouvière & Delmas, 2005). Na polpa de um dente maduro, as fibras simpáticas formam plexos em redor das arteríolas pulpare. A estimulação destas fibras resulta na constrição das arteríolas e diminuição do fluxo sanguíneo (Hargreaves & Cohen, 2011).

Esta rede de nervos, mielinizados e não-mielinizados, representa a camada parietal de nervos ou o plexo subodontoblástico de Raschkow. Este plexo localiza-se na camada de Weil, abaixo dos corpos celulares odontoblásticos (Nanci, 2012) e, segundo Avery & Chiego (2006), “desde a camada parietal, os nervos passam pela zona odontogénica e terminam ao longo dos odontoblastos ou penetram nos túbulos acompanhados pelos prolongamentos dentinários”.

Assim, podemos constatar que a polpa tem funções diversas mas todas igualmente importantes: indutora, formadora, protetora, nutritiva, sensorial e reparadora.

1.4.1 Odontoblasto

Os odontoblastos são células especializadas pulpares pós-mitóticas, organizadas numa camada linear de células em paliçada ao longo da interface polpa-dentina, com 3 a 5 camadas celulares, cujos prolongamentos penetram na pré-dentina e dentina. Constituem a camada odontoblástica da polpa que representa uma barreira natural entre os tecidos mineralizados (esmalte e dentina) e o tecido vivo do dente (a polpa) (Ruch, Lesot, & Begue-kirn, 1995; Nanci, 2012; Bleicher, 2013).

Os odontoblastos são células mesenquimatosas provenientes da crista neural, responsáveis pela formação e manutenção da dentina primária e secundária, dado que organizam e regulam a síntese de matriz de dentina mineralizada (Murray *et al.*, 2000; Arana-Chavez & Massa, 2004; Bleicher, 2013).

As células da crista neural viajam para ocupar o primeiro arco visceral e originam as células da papila dentária, células do periodonto e células ósseas. Da ectoderme oral surge o órgão de esmalte de onde emergem os ameloblastos (Ruch *et al.*, 1995). As células da futura lâmina dentária vão localizar-se na região do epitélio oral e aí iniciam o seu desenvolvimento.

Segundo Nanci (2012) “a diferenciação odontoblástica baseia-se na sinalização de moléculas e fatores de crescimento do epitélio dentário interno”. As células ectomesenquimatosas indiferenciadas, no final da diferenciação, dividem-se originando duas células-filha (Fig. 5). Uma das células-filha, influenciada pelos produtos do epitélio dentário interno, diferencia-se em odontoblasto. A outra célula-filha, que não foi exposta aos produtos das células epiteliais, persiste como célula subodontoblástica (Nanci, 2012). Esta última é uma célula que passou por todo o ciclo celular excepto esta derradeira etapa, ficando estagnada no tempo. Segundo Daud *et al.* (2014) “apesar de não estarem directamente expostas, são capazes de se diferenciarem em *odontoblast-like cells* principalmente durante uma agressão ao dente”.

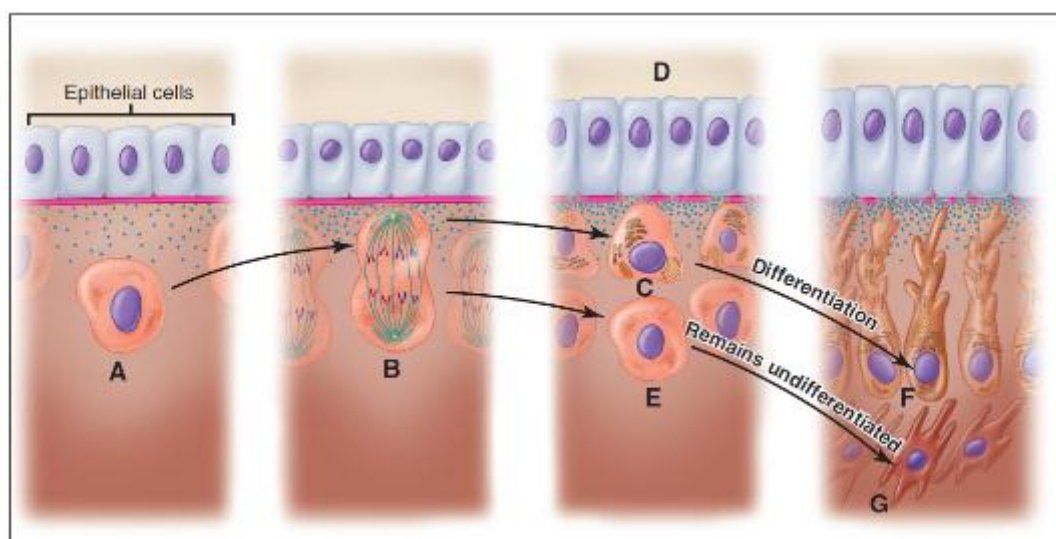


Figura 5 – Imagem representativa da diferenciação odontoblástica. As células ectomesenquimatosas indiferenciadas (A) da papila dentária dividem-se (B) por mitose. Uma célula-filha (C), influenciada pelos produtos do Epitélio Dentário Interno (D) diferencia-se em odontoblasto (F). A outra célula-filha (E), não exposta à influência epitelial, mantém-se como subodontoblasto (G). Adaptado de Nanci (2012).

Os odontoblastos são células polarizadas pela sua morfologia colunar e distribuição assimétrica dos organelos intracelulares e membrana plasmática (Linde & Goldberg, 1993). Consequentemente, Tjäderhane *et al.* (2013) afirmam que “as glicoproteínas virais como marcadores de polaridade demonstram que a membrana plasmática dos prolongamentos odontoblásticos é, por natureza, basolateral e o corpo celular exibe características apicais”.

Comparativamente, o tamanho dos odontoblastos coronários é maior que os odontoblastos radiculares (Avery & Chiego, 2006; Nanci, 2012). Segundo Kumar (2011), “na coroa de um dente totalmente desenvolvido, os corpos celulares dos odontoblastos são colunares e medem aproximadamente 50 µm, enquanto que na porção média da polpa são mais cubóides, e na porção apical têm um aspeto mais achatado”.

A célula odontoblástica exibe, ao longo da vida, uma morfologia que traduz a sua actividade funcional. Couve *et al.* (2013) definem 3 fases principais no ciclo de vida do odontoblasto: fase secretora, fase madura, e fase idosa/envelhecida (Figura 6).

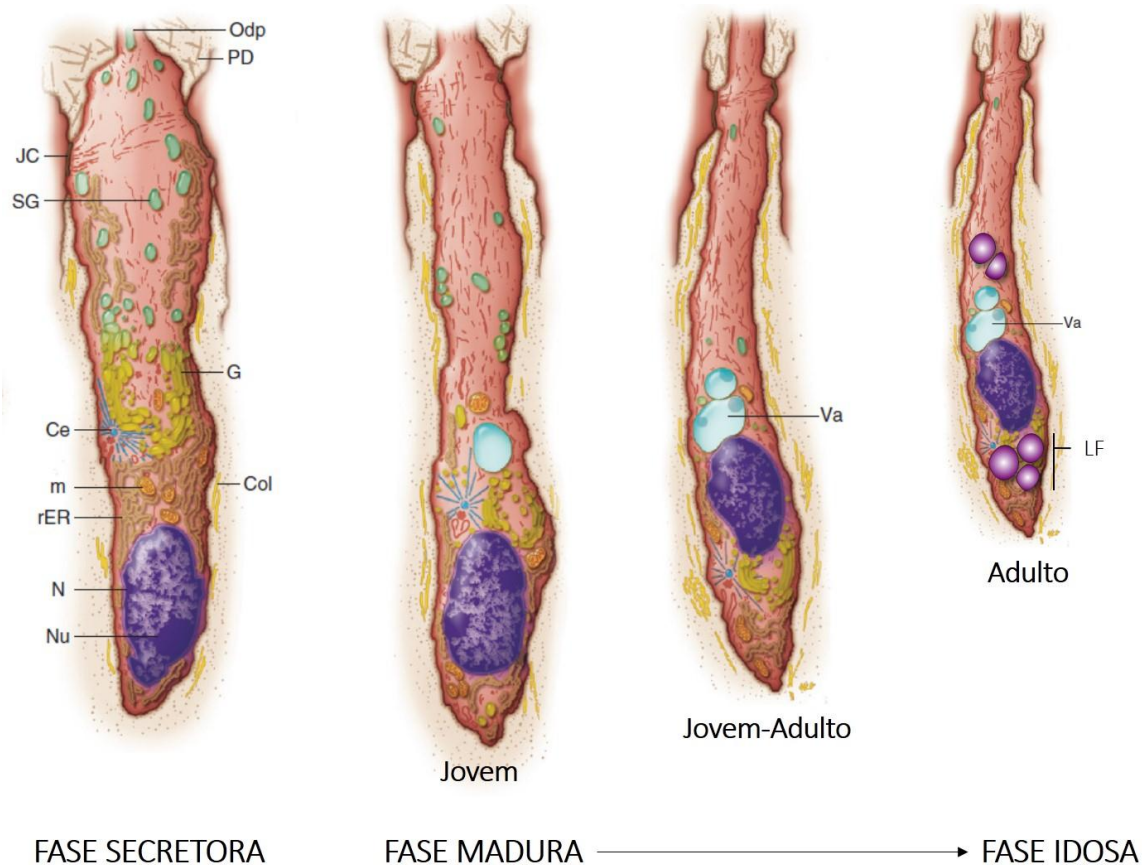


Figura 6 – Imagem representativa do ciclo de vida do odontoblasto.

Odp – prolongamento odontoblástico; PD – pré-dentina; JC – complexo juncional; SG – grânulos de secreção; G – Complexo de Golgi; Ce – centríolos; m – mitocôndrias; Col – colágeno; rER – retículo endoplasmático rugoso; N – núcleo; Nu – nucléolo; Va – Vacúolo; LF – lipofusцина. Modificado de Couve *et al.* (2013).

Segundo Cavacas (2014), o ciclo de vida do odontoblasto passa de “uma fase de alta e diferenciada actividade secretora para uma fase onde essa actividade é reduzida pela capacidade autofágica da própria célula, dando lugar à chamada fase de maturação dos odontoblastos”. De facto, o que observamos na fase secretora do odontoblasto é uma robustez morfológica e organelos proeminentes, num período de alto metabolismo e secreção. Com a fase de maturação, observa-se no odontoblasto uma progressiva diminuição dos organelos, uma crescente acumulação de vacúolos e uma diminuição do tamanho celular. Segundo Couve *et al.* (2012), observamos, durante o envelhecimento da célula odontoblástica, uma crescente acumulação de lipofusцина como “resultado da autofagia mitocondrial” e “que pode explicar a decadência funcional do odontoblasto com a idade”.

Tem-se proposto que os odontoblastos maduros sejam denominados “odontócitos”, numa analogia aos osteócitos. No entanto, o corpo celular dos odontoblastos nunca está incluso em matriz mineralizada, ao contrário dos osteócitos, e o termo “odontoblasto”, segundo Couve *et al.* (2013), “mantém-se válido durante todo o ciclo de vida desta célula refletindo o facto de manter a sua capacidade secretora e sensorial até à sua morte, onde é substituído por *odontoblast-like cells* capazes de formar dentina reparadora”.

Outra particularidade desta célula é a expressão de um cílio primário, uma característica altamente conservada ao longo de todo o seu ciclo de vida (Fig. 7) (Couve, 1986; Magloire, Couble, Romeas, & Bleicher, 2004). Este cílio constitui um “organelo que consiste num cilindro ligado à membrana em torno do axonema, composto por 9 microtúbulos duplos” (Thivichon-Prince *et al.*, 2009). Thivichon-Prince *et al.* (2009) mostraram, pela primeira vez, que o odontoblasto expressa as proteínas major do cílio primário. Hoje em dia, pensa-se que o cílio primário se comporte como um recetor desta sinalização trópica, podendo estar relacionado com a formação de dentina, transmissão sensorial do dente, regulação do fluido dentinário e até mesmo com o movimento desta célula na polpa (Magloire *et al.*, 2004; Thivichon-Prince *et al.*, 2009).

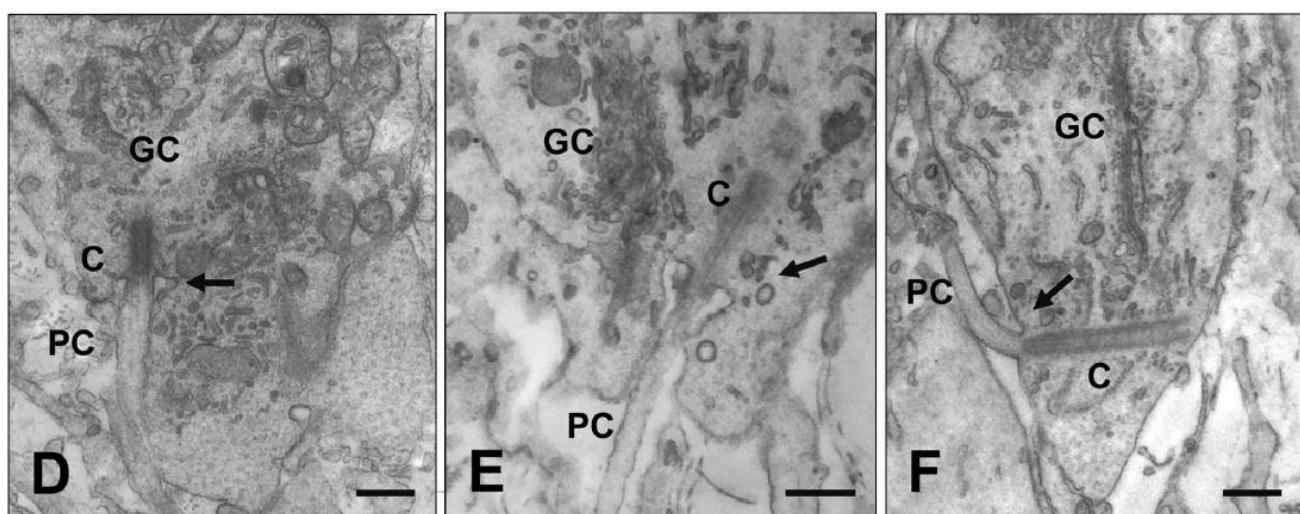


Figura 7 – Microscopia Electrónica de Transmissão de alta ampliação do cílio primário em odontoblastos de jovem (A – 15 anos), jovem-adulto (B – 25 anos) e idoso (C – 75 anos). GC Complexo de Golgi; PC – cílio primário; C – centrossoma. Escala – 0,5 µm. Adaptado de Couve *et al.* (2013).

O prolongamento odontoblástico é o polo secretor do odontoblasto. Inicialmente, o odontoblasto manifesta inúmeros prolongamentos, mas com o desenvolvimento apenas um se desenvolve como principal. Estende-se desde o corpo celular, e quando formado, começa a produção de dentina circumpulpar. À medida que a dentina circumpulpar é depositada, o corpo

celular desloca-se no sentido pulpar e o prolongamento alonga-se. O prolongamento é mais espesso na pré-dentina e vai-se estreitando à medida que percorre o túbulo dentinário, podendo estender-se até à junção amelodentinária. Do prolongamento odontoblástico surgem pequenas ramificações perpendiculares à dentina intertubular, e podem também apresentar conexões intercelulares na dentina. (Sasaki & Garant, 1996; Carda & Peydró, 2006; Nanci, 2012). Segundo Carda e Peydró (2006) “30 a 70% dos prolongamentos são acompanhados por fibras nervosas”.

Outra característica fundamental para os odontoblastos é o estabelecimento de estruturas juncionais especializadas inter-celulares. Estas células apresentam junções do tipo *gap*, *tight* e de ancoragem (aderentes e desmossomas na porção mais apical do corpo celular) (Arana-Chavez & Katchburian, 1997; Hargreaves & Cohen, 2011). Estes complexos juncionais são fundamentais para o dinamismo da camada odontoblástica com as suas variadas funções (Tabela 1).

Tabela 1 - Funções das junções celulares presentes nos odontoblastos. Modificado de Lodish *et al.* (2013).

JUNÇÃO	TIPO DE ADESÃO	FUNÇÃO
Junções de Ancoragem		
I. Junções aderentes	Célula-célula	Forma, Tensão e Sinalização
II. Desmossomas	Célula-célula	Força, Durabilidade e Sinalização
Junções Gap	Célula-célula	Comunicação e Permitem a passagem directa de moléculas entre as células adjacentes
Junções Tight	Célula-célula	Controlam o fluxo de solutos e Sinalização

Além da função primordialmente secretora, os odontoblastos também estão criticamente envolvidos na transmissão de estímulos sensoriais pois expressam canais iónicos relacionados com nocicepção, propagação de sinais, bem como transdução de estímulos químicos, térmicos e mecânicos (Magloire, Couble, Thivichon-Prince, Maurin, & Bleicher, 2009; Bleicher, 2013). Também desempenham um papel na resposta imunitária da polpa contra bactérias cariogénicas ao serem capazes de reconhecer uma grande variedade de componentes bacterianos, sendo potenciadores de respostas inflamatórias (Farges *et al.*, 2008; Bleicher, 2013).

1.4.2 A dinâmica do complexo pulpo-dentinário

O complexo pulpo-dentinário reflete uma simbiose notável que confere ao dente capacidade de se defender e reagir perante as agressões externas. Assim, torna-se importante perceber as transformações celulares e tecidulares deste complexo em situações como:

- Envelhecimento;
- Lesões de cárie;
- Efeito da preparação cavitária;
- Efeitos das técnicas de adesão;
- Desgaste dentário.

1.4.2.1 Envelhecimento do complexo pulpo-dentinário

O complexo pulpo-dentinário, tal como todos os tecidos corporais, altera-se com o tempo. Segundo Nanci, (2012) “a alteração mais conspícua é a diminuição do volume da câmara pulpar e dos canais radiculares pela contínua deposição de dentina”. Num dente envelhecido, o canal radicular apresenta uma quase completa obliteração, e esta restrição contínua do volume pulpar diminui a vascularização da polpa e inicia muitas das restantes alterações pulpares que ocorrem com o envelhecimento (Nanci, 2012; Daud, Nambiar, Hossain, Rahman, & Bakri, 2014).

Podemos observar na dentina, com o envelhecimento: encerramento completo dos túbulos; formação de dentina esclerótica (frequentemente perto do ápex dos dentes de indivíduos de meia-idade), diminuindo a permeabilidade da dentina e tornando-a mais quebradiça; e aumento de tratos mortos aprisionados nos túbulos dentinários (Nanci, 2012).

Daud *et al.* (2014) demonstraram que, a partir dos 20 anos, há uma diminuição gradual da densidade celular de odontoblastos, células subodontoblásticas e fibroblastos pulpares em cerca de 60% até aos 60-80 anos. Constataram também que existem alterações histomorfológicas relevantes:

- Os odontoblastos passam de células com formato colunar para uma morfologia ovóide e mais curta. A disposição pseudo-estratificada torna-se mais evidente com a idade e tornam-se mais compactas entre si (Figura 8 a,b);

- As células subodontoblásticas, que possuem núcleos ovais grandes e citoplasma eosinófilo, tornam-se, com o envelhecimento, progressivamente mais achatadas e com escasso citoplasma (Figura 8 c,d);
- Os fibroblastos, com o envelhecimento, ficam mais achatados e com aspeto mais fusiforme que os fibroblastos jovens (Figura 8 e,f).

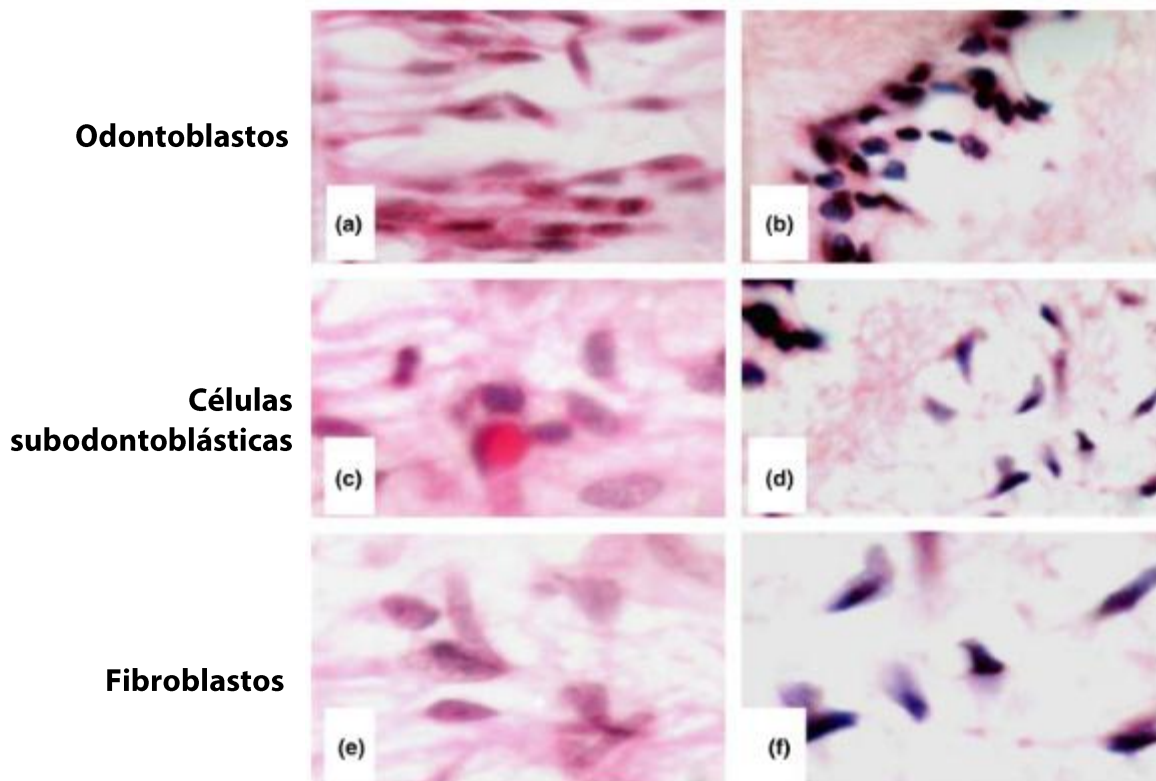


Figura 8 — Imagens de microscopia óptica de cortes histológicos (Hematoxilina-Eosina) que mostram as características histomorfológicas de odontoblastos, células subodontoblásticas e fibroblastos pulpare de 2 grupos: 6-29 anos (a, c, e) e 50-80 anos (b, d, f). (Magnificação 315x). Adaptado de Daud *et al.* (2014).

Outras alterações pulpare que ocorrem com o envelhecimento são: a diminuição de colagénio, levando ao aparecimento de feixes fibróticos; degeneração de axónios mielinizados e não-mielinizados, que, com o aumento de dentina esclerótica e dentina reparadora, explica a redução da sensibilidade ao longo da vida; aparecimento de áreas irregulares de calcificação distrófica, especialmente no centro pulpar (Nanci, 2012).

Com o envelhecimento, há uma redução progressiva na espessura da camada odontoblástica, principalmente pela redução do tamanho das células (Couve, Osorio, & Schmachtenberg, 2012). Consequentemente, como afirmou Murray *et al.*, em (2002), “o envelhecimento afecta as actividades fisiológicas e funcionais dos odontoblastos, resultando numa menor capacidade de responder às agressões e redução da aposição e mineralização de dentina”.

1.4.2.2 Consequências da lesão de cárie no complexo pulpo-dentinário

A cárie é a doença mais prevalente da cavidade oral. Desta forma, é fundamental percebermos as repercussões das lesões de cárie no complexo pulpo-dentinário, desde a fase inicial de lesão de esmalte até à invasão dos tecidos vitais pulpares.

Em 1965, Brännström & Lind mostraram que “as reacções inflamatórias na polpa começam quando o processo carioso ainda está no esmalte”.

Já em 1998, Bjørndal & Thylstrup afirmaram que “as actividades metabólicas do biofilme oral são espelhadas ao longo da interface polpa-dentina numa fase muito precoce da formação da lesão”.

Tal como qualquer tecido do nosso organismo, o complexo pulpo-dentinário evidencia um comportamento defensivo perante situações de *stress* e agressão. A principal forma de defesa da dentina é a esclerose tubular pelos odontoblastos (Magloire, Bouvier, & Joffre, 1992). À medida que a lesão de cárie progride, os odontoblastos vão depositando minerais nos túbulos dentinários como resposta de defesa e, conforme Fejerskov & Kidd (2008), “esta obliteração tubular pelos minerais, reduz ou bloqueia o fluido dentinário e, ainda, reduz a hipersensibilidade a estímulos como o frio ou o jato de ar”.

Na polpa observam-se, em lesões de cárie activa, proliferações celulares na região subodontoblástica e já foram encontradas células dendríticas em fases precoces (Fejerskov & Kidd 2008).

Em lesões de cárie de progressão lenta, segundo Fejerskov & Kidd (2008), “a obliteração tubular é contínua, não apenas pelo crescimento de dentina peritubular mas também como resultado da re-precipitação dos sais minerais dentro dos túbulos”.

Em lesões de progressão rápida, a resposta de defesa dentinária passa pela produção de dentina terciária (reacional ou reparadora). Se os odontoblastos primários conseguirem suportar a agressão produzem dentina reacional. Se os estímulos forem muito agressivos, os

odontoblastos originais são destruídos e substituídos pelas *odontoblast like-cells* que produzem dentina reparadora (Smith *et al.*, 1995). A qualidade da dentina terciária está relacionada com a actividade da lesão, activa ou inactiva.

Com a progressão da lesão de cárie ao longo da dentina, pode haver odontalgia e pulpite, aguda ou crónica (Fejerskov & Kidd, 2008; Hargreaves & Cohen, 2011).

Na pulpite aguda predominam os leucócitos polimorfonucleares. Já as reacções pulpare a lesões de cárie profundas exibem exsudados inflamatórios crónicos com linfócitos, macrófagos e plasmócitos, e formação de dentina terciária. A infiltração celular subjacente às lesões de cárie variam com a intensidade, e os leucócitos podem infiltrar a camada odontoblástica e a área subodontoblástica, onde podem destruir os odontoblastos Fejerskov & Kidd (2008). Segundo Magloire *et. al* (1992) esta destruição de odontoblastos forma uma “matriz específica de restos de odontoblastos e de tecidos, rica em moléculas activas, que estimulam as células pulpare a elaborar uma camada tipo cartilagem (com colagénio tipo II e XI), seguida da formação de dentina atubular pelas *odontoblast-like cells*”. Os mesmos autores afirmam que “a resposta dos odontoblastos é idêntica à resposta de células ósseas a uma agressão”.

Se o processo de cárie continua, a polpa pode, eventualmente, degenerar. A inflamação, como resposta tecidular é o principal mecanismo de defesa contra trauma, agentes nóxicos e eventos imunológicos. A inflamação só é destrutiva para a polpa em casos avançados, onde o edema é acompanhado por compressão dos vasos. O aumento da pressão dos fluidos tecidulares dentro da polpa pode resultar em odontalgia e necrose (Fejerskov & Kidd, 2008).

1.4.2.3 O efeito da preparação cavitária no complexo pulpo-dentinário

Ohshima (1990) estudou o impacto da preparação cavitária sobre os odontoblastos e capilares pulpaes, em molares de ratos Wistar (Fig. 9). O autor constatou que:

- Imediatamente após a preparação cavitária, os odontoblastos ficaram danificados e foram separados da pré-dentina por um exsudado inflamatório rico em fragmentos de odontoblastos destruídos. Verificou-se que houve aspiração de núcleos odontoblásticos para o interior dos túbulos dentinários. A rede capilar subodontoblástica deslocou-se no sentido da polpa, consequência da pressão exercida pelo exsudado;
- Ao fim de 6 horas, os odontoblastos diminuíram em número e começaram a evidenciar figuras picnóticas;
- Um dia após a preparação cavitária, a quantidade de fragmentos celulares diminuíram e identificaram-se células inflamatórias (leucócitos polimorfonucleares e macrófagos) na camada odontoblástica degenerada. Em redor dos capilares, encontravam-se muitas células com uma alta relação Núcleo/Citoplasma e nucléolos proeminentes. Os núcleos no interior dos túbulos dentinários ainda eram identificáveis;
- Ao fim de 3 dias, o exsudado e os fragmentos celulares praticamente desapareceram. Começaram a alinhar-se novas células odontoblásticas de aspeto fusiforme e com capacidade formadora, criando uma nova camada odontoblástica;
- Aos 5 dias, os capilares já não se encontravam rodeados por elementos celulares. Os odontoblastos recém-formados aumentaram em altura e começaram a produzir dentina reparadora. Verificou-se a existência de dois tipos de odontoblastos: células escuras (com um complexo de Golgi bem-desenvolvido e um grande número de Retículos Endoplasmáticos Rugosos) e células claras (com poucos organelos);
- Aos 10 dias, já se formou uma grande quantidade de dentina reparadora, distinguível da dentina primária pelo arranjo tubular irregular. Os odontoblastos diminuíram em altura;
- Aos 20-30 dias, os odontoblastos diminuíram em tamanho e em número de organelos, quando comparados com os dos 10 dias pós-preparação. Os capilares estabeleceram-se na camada subodontoblástica a uma curta distância dos odontoblastos, semelhante ao que se observou nos dentes controlo. A camada odontoblástica era manifestamente diferente em espessura, organização e tipo celular da camada observada nos dentes controlo.

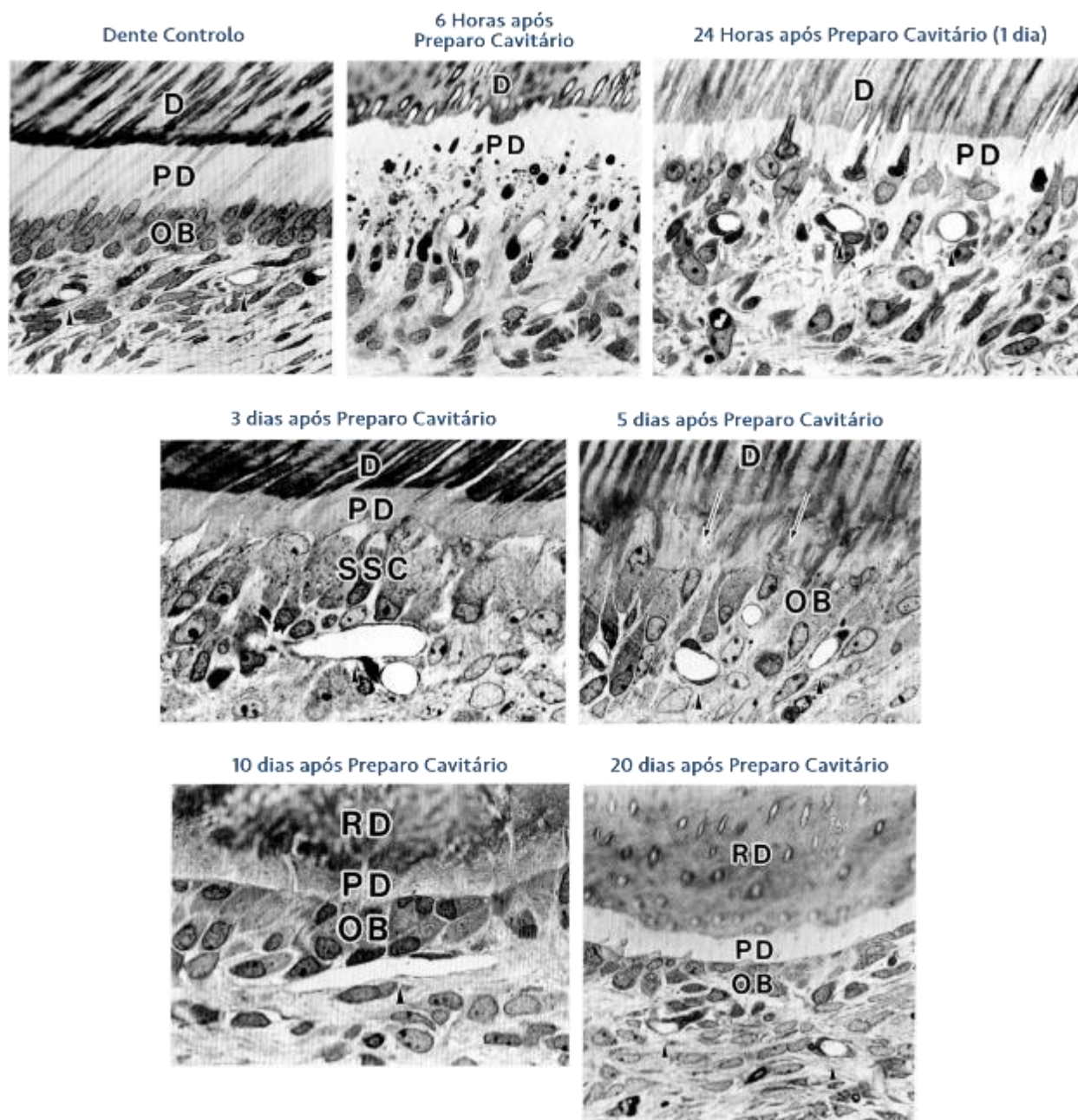


Figura 9 – Resposta e alterações ultraestruturais da camada odontoblástica e capilares subodontoblásticos após a preparação cavitária de molares de rato. D – Dentina; PD – Pré-dentina; OB – odontoblastos; RD – Dentina Reparadora; SSC – odontoblastos recém-formados fusiformes. Adaptado de Ohshima (1990).

Assim, após preparação cavitária, a resposta dos odontoblastos é a fragmentação, degeneração celular e aspiração dos núcleos para o interior dos túbulos dentinários, bem como o deslocamento do remanescente da camada odontoblástica, em direção pulpar, por pressão do exsudado inflamatório.

Murray *et al* (2000) estudaram o efeito da preparação cavitária em odontoblastos humanos. Comprovaram que “o número de odontoblastos pode ser preservado após preparação cavitária

e procedimento restaurador” (Murray et al., 2000). Contrariamente ao estudo de Ohshima, a extração dos dentes ocorreu entre os 28-163 dias, impossibilitando a observação da resposta dos odontoblastos nos primeiros dias. No entanto, é possível observar, na figura 6, a reorganização celular da nova camada odontoblástica como resposta à preparação cavitária e a formação de dentina reparadora. Nesta, são evidentes as diferenças entre uma camada odontoblástica pseudo-estratificada em paliçada típica e uma camada odontoblástica singular de odontoblastos recém-formados menos organizada e de aspeto fusiforme, corroborando os resultados de Ohshima.

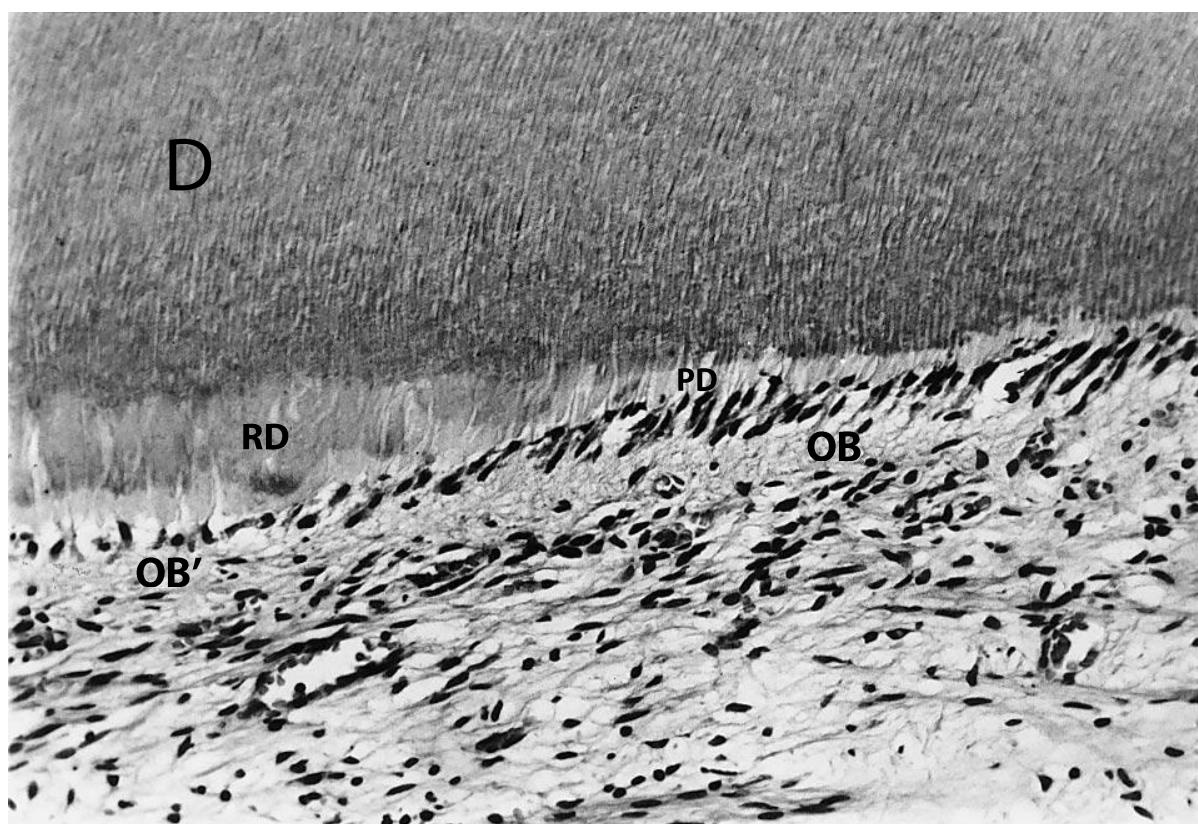


Figura 10 – Odontoblastos associados a áreas de dentinogênese reacional e áreas de dentina adjacente. Paciente do sexo feminino; 14 anos de idade; extração efetuada 57 dias após restauração da cavidade. D – Dentina; PD – Pré-dentina; OB – camada odontoblástica na sua forma nativa; OB’ – camada odontoblástica singular, sem padrão em paliçada, menos organizada e com células de aspeto fusiforme; RD – Dentina Reparadora. Adaptado de Murray *et al.* (2000).

Apesar dos efeitos nefastos que a preparação cavitária produz no complexo pulpo-dentinário, haverá sempre formas de tentar de minimizá-los: refrigeração contínua durante a instrumentação, corte intermitente, brocas novas, pressão ligeira. No entanto, existem escassos estudos que abordem este tema.

1.4.2.4 O efeito das técnicas de adesão no complexo pulpo-dentinário

Salles Scheffel *et al.* (2015) compararam os efeitos pós-operatórios (48 horas) do “*ethanol-wet bonding*”, nos tecidos pulpaes, com os efeitos do “*water-wet bonding*” (Fig.11). Em todos os dentes do grupo *ethanol-wet bonding* e em 83,33% dos dentes do grupo *water-wet bonding* apresentaram um ligeiro infiltrado inflamatório celular (com leucócitos polimorfonucleares e mononucleares), desorganização/disrupção da camada odontoblástica, polpa central normal e sem formação de dentina reacional.

Diversos estudos mostraram que, quanto mais profundo for o procedimento restaurador, e portanto mais perto do complexo pulpo-dentinário, maior a probabilidade de haver repercussões ao nível do complexo pulpo-dentinário (Pashley, 1996; Perdigão, 2010; Perdigão, Reis, & Loguercio, 2013)

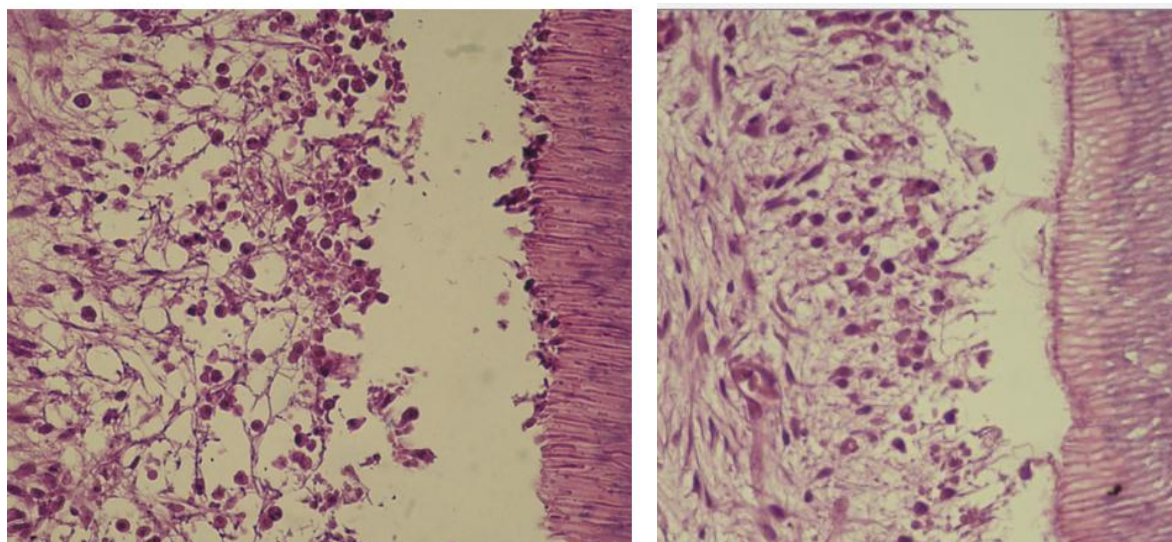


Figura 11 – Imagens de Microscopia Óptica de alta magnificação da resposta pulpar 48 horas após *ethanol-wet bonding* (à esquerda) e *water-wet bonding* (à direita). Observa-se disrupção da camada odontoblástica, infiltrado inflamatório e nenhuma deposição de dentina reaccional. Adaptado de Salles Scheffel *et al.* (2015).

1.4.2.5 O desgaste dentário e o complexo pulpo-dentinário

Como afirma Cavacas *et al.* (2015) “o ruído industrial é um fator importante na patogénese do desgaste dentário”, tal como a atrição e a abração.

Num estudo experimental sobre o efeito do ruído industrial sobre a dentina circumpulpar por F.E.S.E.M. (Field Emission Scanning Electron Microscopy), Cavacas *et al.* (2013) relataram nos animais submetidos ao ruído “a presença de uma estrutura em forma de banda entre a dentina e a polpa, compatível com dentina terciária” (Fig. 12). As fibras de colagénio ficaram

aprisionadas pela matriz mineralizada recém-formada. Esta banda era mais carbonatada que a dentina e a organização da malha de colagénio era mais espaçada e desorganizada que nos animais de controlo.

Cavacas *et al.* (2013) inferiram que “o ruído industrial constitui um forte estímulo capaz de danificar os odontoblastos, promovendo a formação de dentina terciária reparadora”. Estabeleceram também que, “este processo envelhece precocemente o dente, tanto pelo impacto direto do ruído pela vibração das estruturas, como pelo aumento do *stress* que acelera o desgaste dentário”.

Em 2015, Cavacas *et al.* observaram que a área média de perda de cúspide de molares, em animais submetidos ao ruído, era significativamente diferente da perda dos animais de controlo. Ao fim de 7 meses, no grupo controlo a perda foi de 17,3% e no grupo exposto foi de 46,5 %. Singularmente, entre o 4º e o 7º mês, os autores constataram “uma diminuição da dentinogénese reacional com o aumento da dentina terciária depositada”, que pode ser explicada “pela distância entre os odontoblastos, responsáveis pela produção de dentina terciária, e os túbulos dentinários, limitando a estimulação subsequente dos odontoblastos e causando a atenuação da dentinogénese reacional, bem como, uma adaptação do organismo às condições causadoras de *stress*”.

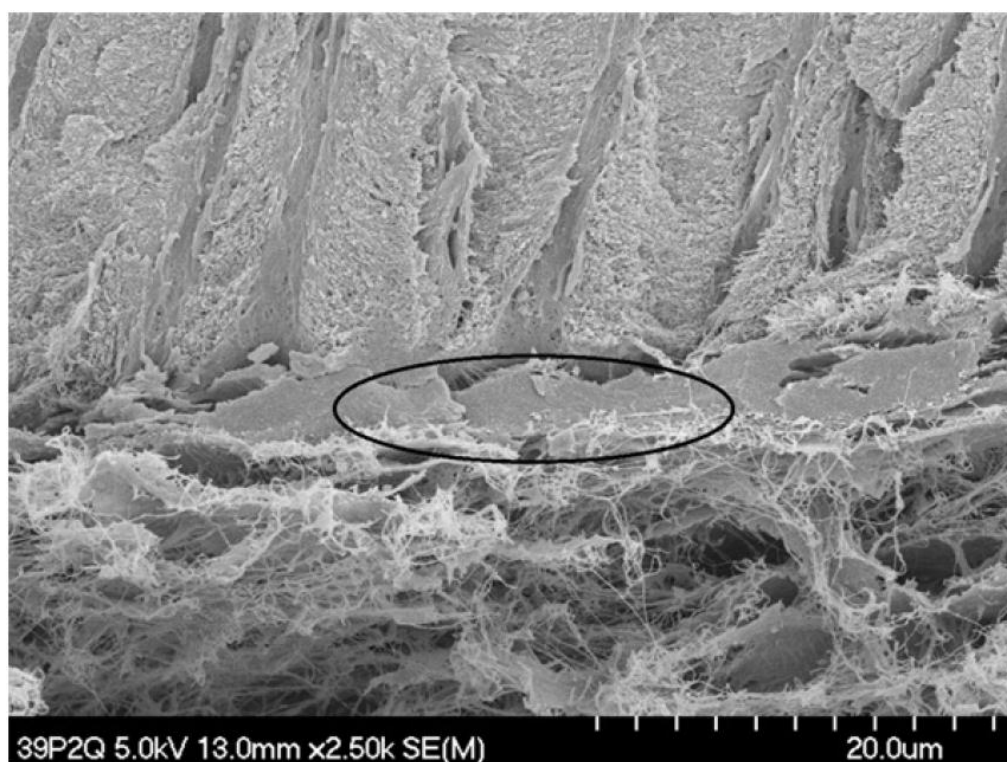


Figura 12 – Micrografia por F.E.S.E.M. do teto da câmara pulpar de um animal exposto ao ruído. Entre a dentina e a polpa, observa-se uma banda densa (círculo). Adaptado de Cavacas *et al.* (2013).

II. Objectivos e Hipóteses

Este trabalho tem por objectivo:

- Avaliar histomorfologicamente se o dente, suplementado com soro de cultura celular e incubado em estufa controlada, é um método de cultura orgânico *in situ* de odontoblastos viável.

As hipóteses de estudo são:

- **Hipótese nula (H_0):** não encontramos semelhanças histomorfológicas da polpa dos grupos de cultura com DMEM (+1, +4 e +7 dias) com o grupo de controlo positivo
- **Hipótese alternativa (H_1):** encontramos semelhanças histomorfológicas da polpa dos grupos de cultura com DMEM (+1, +4 e +7 dias) com o grupo de controlo positivo.

III. Material e Métodos

CrITÉrios

Para o presente estudo, todos os dentes utilizados foram obtidos na Clínica Universitária Egas Moniz, decorrentes dos tratamentos regulares dos pacientes, seguindo as normas do Banco de Dentes Humanos da Clínica Universitária. Cada participante foi informado e assinou o respetivo consentimento.

Foram utilizados 30 dentes molares.

Como critérios de inclusão, optou-se por se seleccionar terceiros molares superiores e inferiores hígidos com indicação para extração em pacientes entre os 18 e 25 anos de idade.

Contrariamente, como critérios de exclusão definiram-se terceiros molares superiores e inferiores não-hígidos: isto é, com lesão de cárie activa ou inactiva; com presença de restaurações (provisórias ou definitivas); que tenham sofrido forças ortodônticas; com lesões dos tecidos duros dentários (atrição, abrasão, erosão ou abfraction); com presença de lesão periapical ou lateral presente nas radiografias complementares e/ou sintomatologia concomitante (periodontite apical aguda, periodontite apical crónica, abscesso, granuloma ou quisto); decorrentes de lesão periodontal; consequentes de situações inflamatórias pulpares ou qualquer tipo de fratura.

Protocolo Experimental

Cada dente, imediatamente após extração, foi lavado correntemente com água, condicionado com álcool etílico a 98% e solução desinfectante (Foam Unisepta®). No caso de haver tecidos moles agregados, foram removidos com uma cureta cirúrgica.

Para possibilitar a entrada do soro de cultura nos tecidos pulpares, optou-se por efetuar um corte horizontal no dente e exhibir o complexo pulpo dentinário apicalmente (Tjaderhane, Salo, Larjava, Larmas, & Overall, 1998).

Para padronização, todos os cortes foram executados ao nível da junção amelocementária, com o auxílio de uma turbina e de broca de odontosseção cirúrgica Zekrya FG (Maillefer-Dentsply®). O corte foi efetuado com irrigação contínua para prevenir o calor friccional da polpa e a consequente morte dos odontoblastos e alterações pulpares (P E Murray et al., 2000).

Por motivos de segurança, enquanto a peça era seccionada, fixou-se a coroa com um boticão cirúrgico nº.0104-2 (ASA Dental®). O remanescente apical foi dispensado.

Prontamente, a peça foi colocada num tubo de recolha de dentes do Banco de Dentes Humanos da Clínica Universitária, e seguiu para o procedimento.

Os 30 dentes, após a preparação descrita, foram aleatoriamente divididos em 6 grupos principais:

- Grupo 0 (controlo positivo): 5 dentes;
- Grupo SF (soro fisiológico) (controlo negativo): 5 dentes;
- Grupo SM (sem meio) (controlo negativo): 5 dentes;
- Grupo +1 dia (com soro DMEM): 5 dentes;
- Grupo +4 dias (com soro DMEM): 5 dentes;
- Grupo +7 dias (com soro DMEM): 5 dentes.

Relativamente ao **Grupo 0** (controlo positivo), os dentes foram colocados em tubos Falcon® 50ml com Formaldeído (3,7-4,0% tamponado em pH 7 e estabilizado com metanol, Panreac®).

Em relação ao **Grupo SF** (controlo negativo), os dentes foram colocados numa estufa universal (Mettmert®) a 37°C, em tubos Falcon® 50ml (Fig. 13), com Soro Fisiológico, durante 11 dias. Não houve renovação do soro fisiológico. As peças foram controladas diariamente para observação de alterações.

Analogamente, os dentes do **Grupo SM** (controlo negativo) foram colocados numa estufa universal (Mettmert®) a 37°C, em tubos Falcon® 50ml, sem meio, durante 3 dias. Os dentes foram controlados diariamente.

Relativamente ao **Grupo +1 dia**, os dentes foram colocados em estufa universal (Mettmert®) a 37°C, numa placa de 24 poços (Fig. 14 e 15), (VWR®, 734-2325) com soro DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Life Technologies®) suplementado (Tabela 2), durante 1 dia.

Em relação ao **Grupo +4 dias**, os dentes foram colocados em estufa universal (Mettmert®) a 37°C, na placa de 24 poços (VWR®, 734-2325), com soro DMEM suplementado, durante 4 dias. O soro DMEM foi trocado no intervalo de 2 dias.

Em relação ao **Grupo +7 dias**, os dentes foram colocados em estufa universal (Mettmert®) a 37°C, na placa de 24 poços (VWR®, 734-2325), com soro DMEM suplementado, durante 7 dias. O soro DMEM foi trocado a cada 2 dias.

Tabela 2 – Constituintes e Suplementos do soro DMEM (1000 ml)

Constituintes	Concentração
Glucose	4500 mg/L
L-Glutamina	4 mM/L
Piruvato de Sódio	25 mM/L
Suplementos	Concentração
Soro Bovino Fetal (FBS)	100 mL/L
Meio Essencial Mínimo (MEM) (Sigma-Aldrich®)	1 mL/L
Penicilina/Estreptomicina	1 µg/1mg /L
Fungizona	2,5 mg/ml /L

Após o tempo estipulado, todas as peças foram fixadas em Formaldeído (3,7-4,0% tamponado em pH 7 e estabilizado com metanol, Panreac®) nos respectivos tubos Falcon® 50ml.

Em seguida, após fixação em formol, todos os grupos seguiram para o procedimento de descalcificação.

Protocolo de Descalcificação

No próprio recipiente, os dentes foram imersos em Ácido Tricloroacético (5%) durante 45 dias (Sanjai *et al.*, 2012). O Ácido Tricloroacético foi trocado a cada 7 dias.

Inicialmente, o controlo da descalcificação das peças foi clínico. Após observação e palpação, devido ao atraso na descalcificação, optou-se por colocar as peças com o descalcificante numa estufa a 45°C, para acelerar a descalcificação (Sanjai *et al.*, 2012). Entretanto, controlou-se a descalcificação radiograficamente quando as peças apresentaram alguma evolução.

Devido à maior espessura de esmalte oclusal (Fig. 16), a descalcificação nesta zona foi mais demorada. Optou-se por emergir apenas a porção coronária que apresentava esmalte em Biodec R (Bio-Optica ® – ácido clorídrico, ácido fórmico, água destilada) durante 10 dias. A porção apical (câmara pulpar exposta) foi coberta com uma gaze embebida em formol. Após este período as peças foram lavadas em água corrente e repousaram 24 horas em formol.

Em seguida, os dentes foram cortados longitudinalmente no seu maior eixo e colocados em Ácido Tricloroacético durante mais alguns dias. Por fim, permaneceram em formol até ao procedimento de parafinização.

Microscopia Óptica

As peças foram incluídas pelo método de parafinização, cortadas no sentido longitudinal em micrótomo e coradas com a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE).

Os cortes foram observados em microscópio óptico Leica® DMLB, e fotografado com Leica® DFC290 HD utilizando o *software* L.A.S. (Leica *Application Suite*).

Análise Estatística

A análise estatística descritiva foi efetuada com o *software* SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), versão 22 para Windows®.

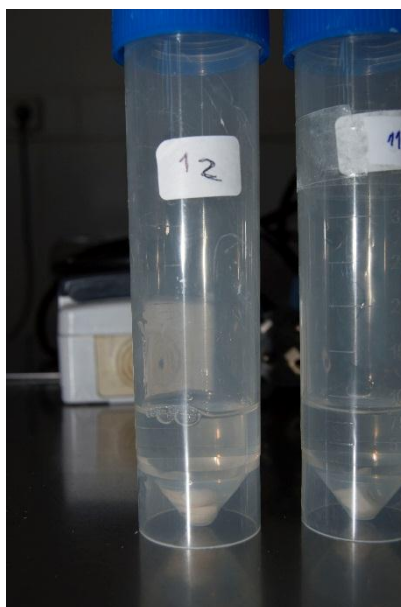


Figura 13 – Amostras em formol (10%) num Falcon® 50ml.



Figura 14 – Placa de 24 poços, com algumas amostras submergidas em soro DMEM.



Figura 15 – Dente colocado num dos poços da placa, submergido em soro DMEM.



Figura 16 – Dente durante o processo de descalcificação. Observamos que durante a descalcificação, a quantidade de esmalte oclusal é ainda considerável. Nas faces axiais já observamos dentina, tendo em consideração a menor espessura de esmalte nessa zona.

IV. Resultados

1. Caracterização da amostra

1.1 Posição na arcada

Neste estudo, foram utilizados 30 terceiros molares. Como se pode observar na tabela 3, a maioria dos dentes eram terceiros molares superiores (73,3 %, n = 22), enquanto que os restantes eram terceiros molares inferiores (26,7%, n= 8).

Tabela 3 - Posição na arcada dos dentes utilizados no estudo

	Frequência	Percentagem (%)
Superior	22	73,3
Inferior	8	26,7
Total	30	100,0

1.2 Quanto ao género

No presente estudo, a maioria das peças dentárias provinham de indivíduos do sexo feminino (73,3 %, n = 22), enquanto que os restantes eram do sexo masculino (26,7%, n = 8) (Tabela 4).

Tabela 4 – Género do paciente

	Frequência	Percentagem (%)
Masculino	8	26,7
Feminino	22	73,3
Total	30	100,0

1.3 Quanto à rizogénese

Neste estudo, a maioria dos dentes apresentavam rizogénese completa (86,7 %, n = 26), e os restantes tinham rizogénese incompleta (13,3%, n = 4) (Tabela 5).

Tabela 5 – Rizogénese das peças dentárias

	Frequência	Percentagem (%)
Rizogénese completa	26	86,7
Rizogénese incompleta	4	13,3
Total	30	100,0

2. Análise Histomorfológica

2.1 Testes-piloto de descalcificação

Efetuaram-se testes-piloto de descalcificação onde se testou ácido nítrico (5%), ácido tricloroacético (5%) e EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) (5%) em dentes fixados imediatamente após extração. Na figura 17 podemos observar que, em comparação com a descalcificação com o ácido tricloroacético (Fig. 17B), o dente descalcificado em ácido nítrico (Fig. 17A) apresenta uma pré-dentina menos densa, uma camada odontoblástica singular e atípica, e uma menor densidade celular.

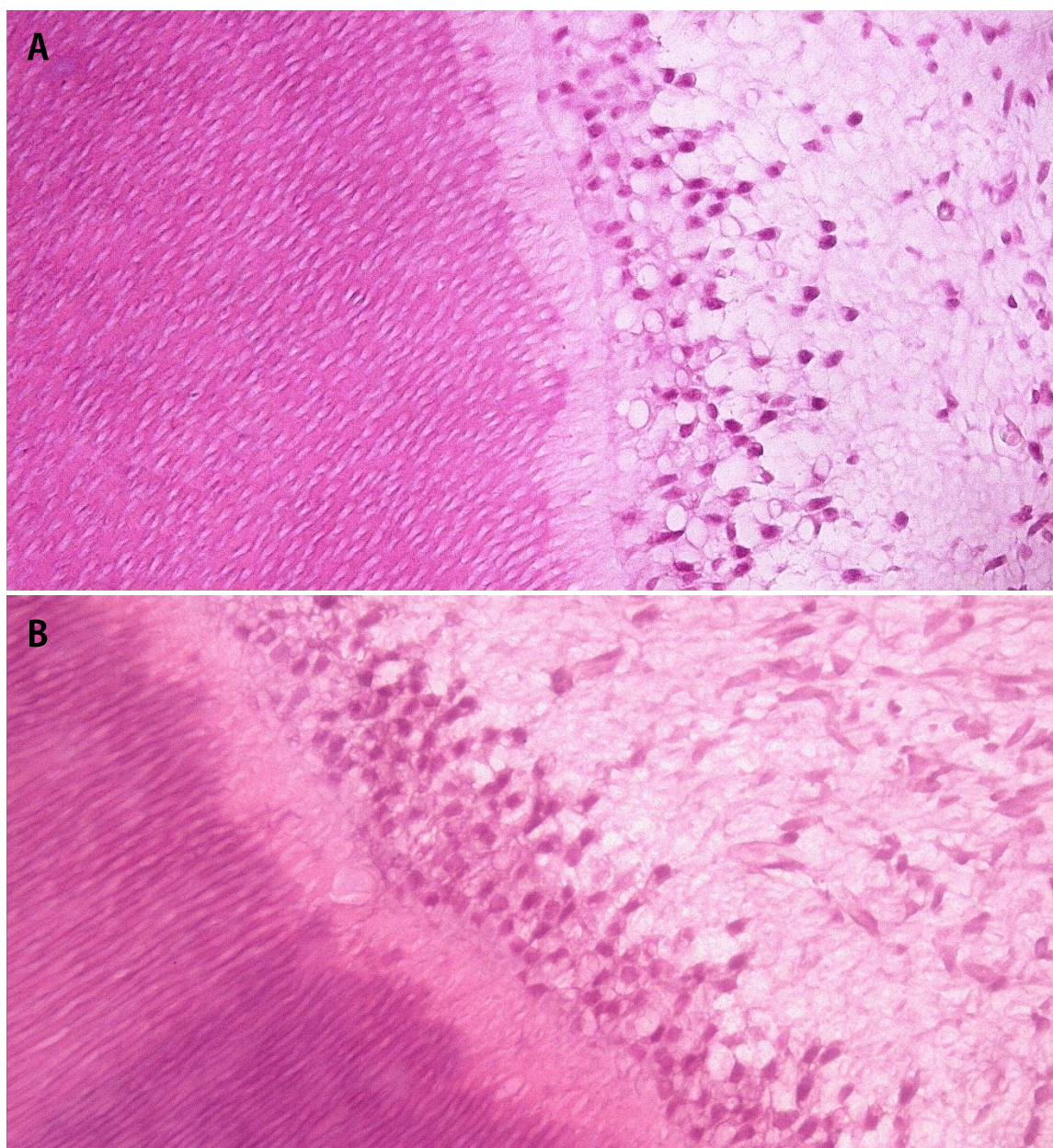


Figura 17 – Fotomicrografias de cortes transversais de dentes descalcificados em ácido nítrico (A) (magnificação 400x, coloração HE) e em ácido tricloroacético (B) (magnificação 400x, coloração HE).

2.2 Grupos

2.2.1 Grupo 0 (Controlo Positivo)

A figura 18 representa os tecidos pulpo-dentinários de um dente do grupo 0, numa região próxima do corno pulpar. Podemos observar a dentina secundária circumpulpar, pré-dentina homogénea, uma camada odontoblástica pseudo-estratificada em paliçada, com uma morfologia celular em “forma de pera” e fusiformes, condizente com a região. Observam-se também vesículas de matriz ao longo da camada odontoblástica.

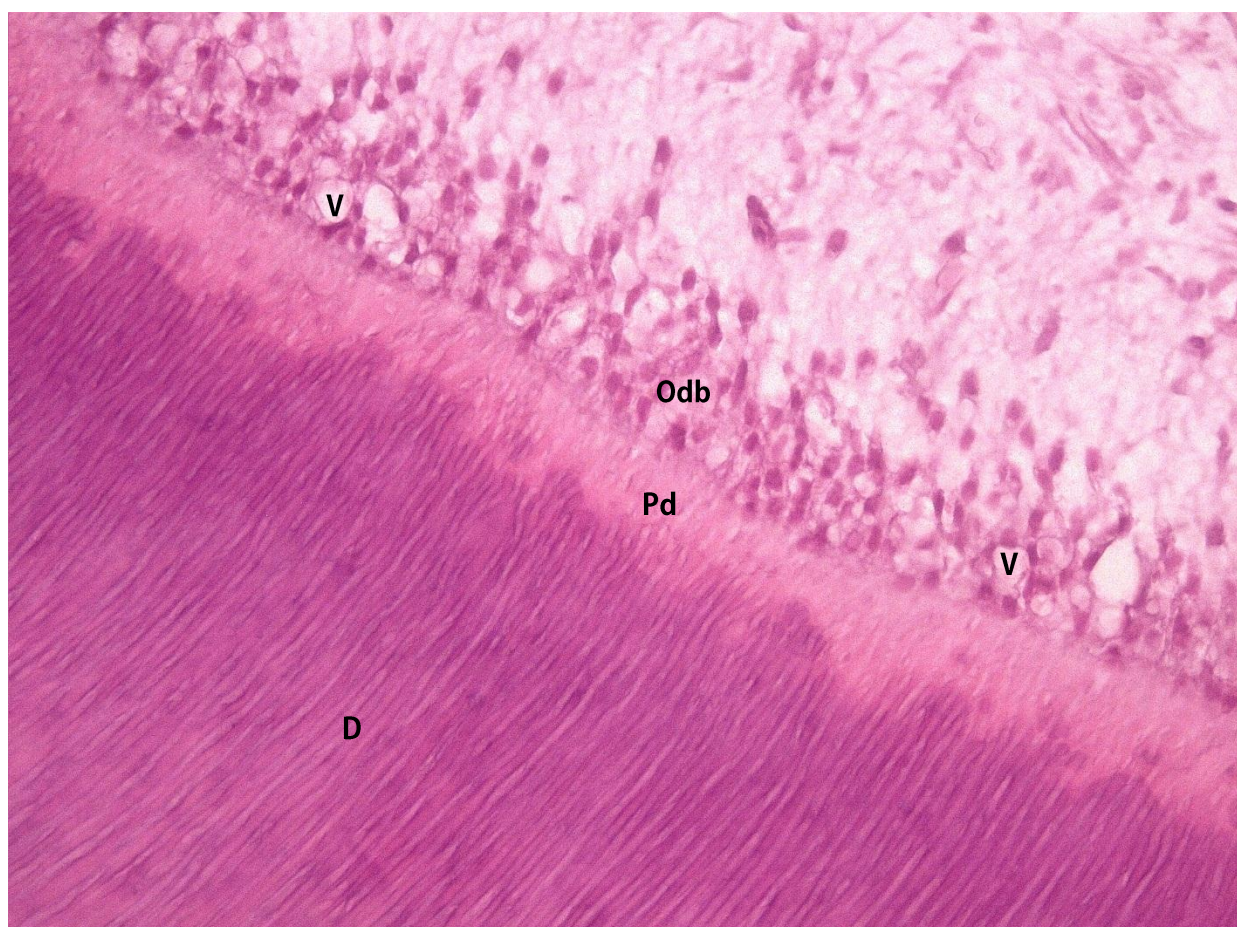


Figura 18 – Fotomicrografia óptica de corte transversal de dente do grupo 0 (Magnificação 400x; Coloração HE). Constata-se a presença de Dentina (D), Pré-dentina (Pd), Camada odontoblástica (Odb), vesículas de matriz (V).

2.2.2 Grupo SF (Controlo Negativo)

A figura 20 representa os tecidos pulpo-dentinários de um dente do grupo SF. Macroscopicamente, antes e após o tempo estipulado em estufa, podemos observar uma alteração na região de um dos cornos pulpares (Fig. 19). Microscopicamente, podemos observar a dentina circumpulpar. No entanto, há o colapso generalizado e astenia do tecido pulpar, principalmente na região do corno (Fig. 20), compatível com as observações macroscópicas. Nas zonas onde persiste o contacto com a camada odontoblástica observa-se lise celular. É de destacar a ausência de pré-dentina.

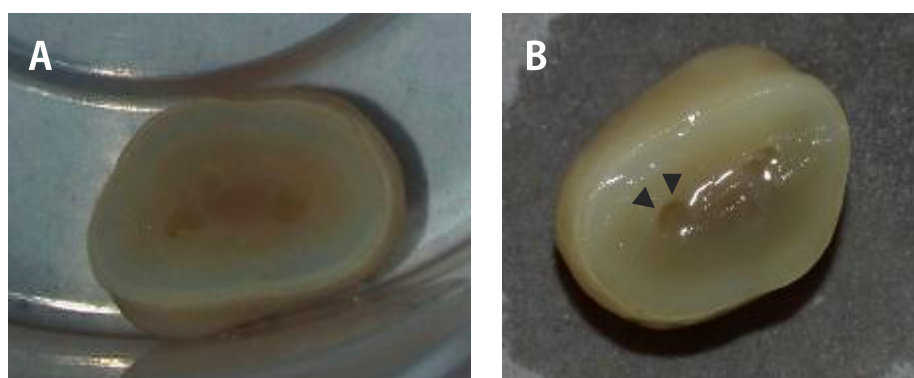


Figura 19 – Macrofotografia de um dente do grupo SF antes (A) e após 11 dias em estufa controlada. Observa-se o colapso (setas) de um dos cornos pulpares após o tempo em estufa.

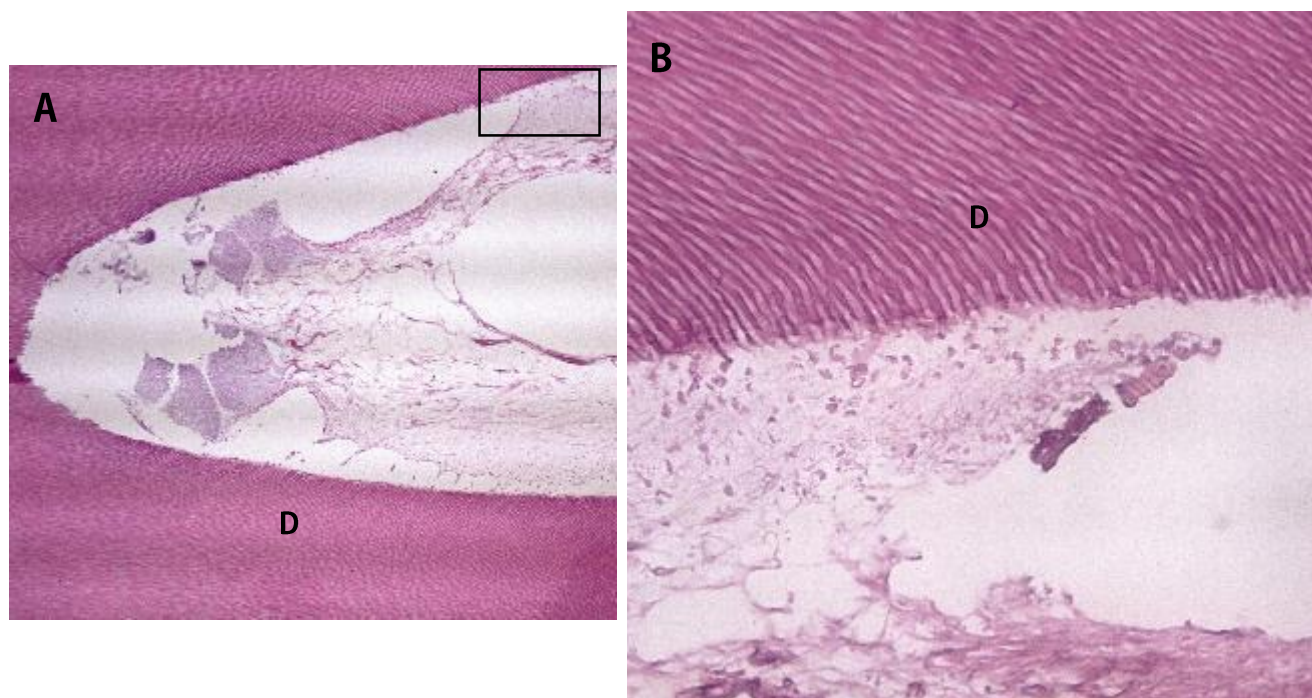


Figura 20 – (A) Fotomicrografia óptica de corte transversal de dente do grupo SF (Magnificação 100x; Coloração HE). (B) Fotomicrografia óptica da ampliação da região rectangular em A (Magnificação 400x; Coloração HE) de uma região pulpar colapsada. D- Dentina.

2.2.3 Grupo SM (Controlo Negativo)

A figura 22 representa os tecidos pulpo-dentinários de um dente do grupo SM. Macroscopicamente, é evidente o colapso do tecido pulpar (Fig. 21). Microscopicamente, podemos observar dentina circumpulpar, ausência de tecido pulpar, e na região do teto pulpar observa-se o colapso e o empurramento do conteúdo pulpar no sentido da dentina (Fig. 22). É evidente a acumulação de tecido celular nesta região e a presença de vestígios nucleares. Não se observa camada odontoblástica nem pré-dentina.

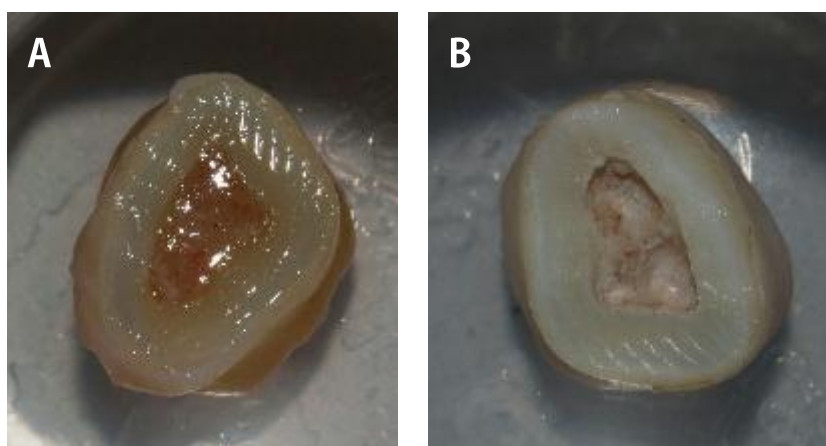


Figura 21 – Macrofotografia de dente do grupo SM antes de ser colocado em estufa controlada (A) e após 3 dias (B). Observa-se o colapso que o tecido pulpar sofreu (B).

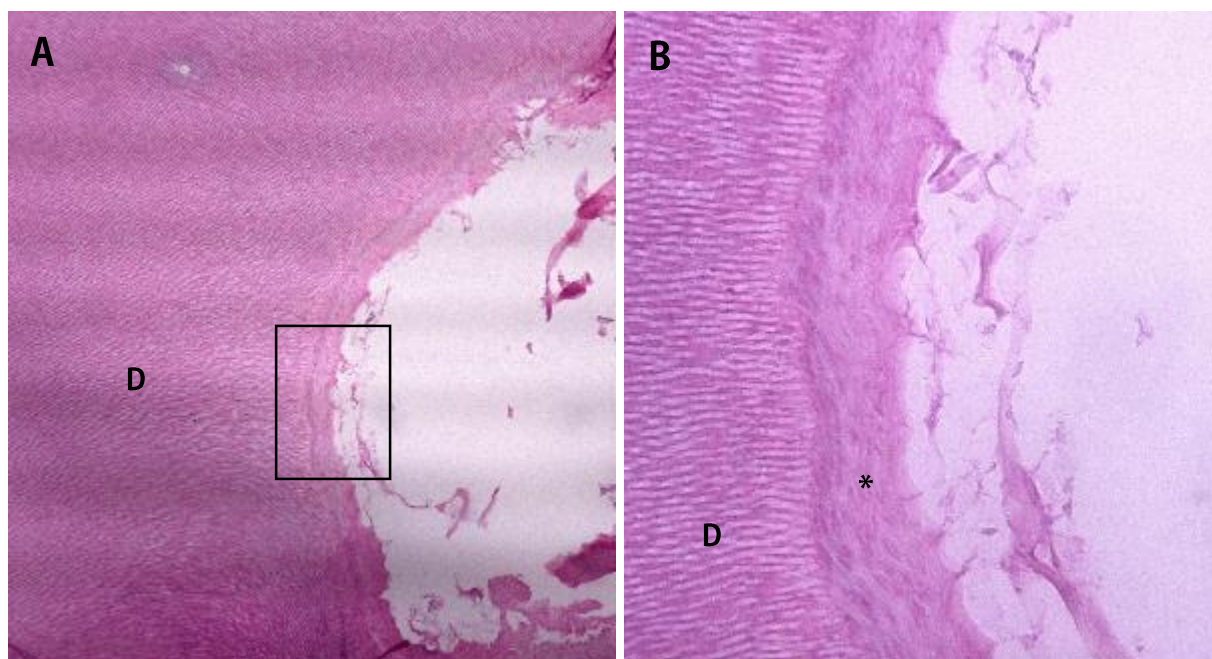


Figura 22 – (A) Fotomicrografia óptica de corte transversal de dente do grupo SM (Magnificação 100x; Coloração HE). (B) Fotomicrografia óptica da ampliação da região rectangular em A (Magnificação 400x; Coloração HE), onde se observa o colapso e a compressão pulpar no sentido da dentina. D- Dentina.

2.2.4 Grupo +1 dia

A figura 23 exibe os tecidos pulpo-dentinários de um dente do grupo +1 dia. Na região mais cervical denota-se uma camada odontoblástica pseudo-estratificada mais densa que na restante região pulpar e uma camada de pré-dentina mais espessa. À medida que se progride até ao corno pulpar, a camada odontoblástica torna-se singular e menos densa e as células odontoblásticas estão parcialmente despegadas da pré-dentina, permitindo a visualização dos prolongamentos odontoblásticos. Podemos observar junto ao corno pulpar uma região de disrupção da camada odontoblástica.

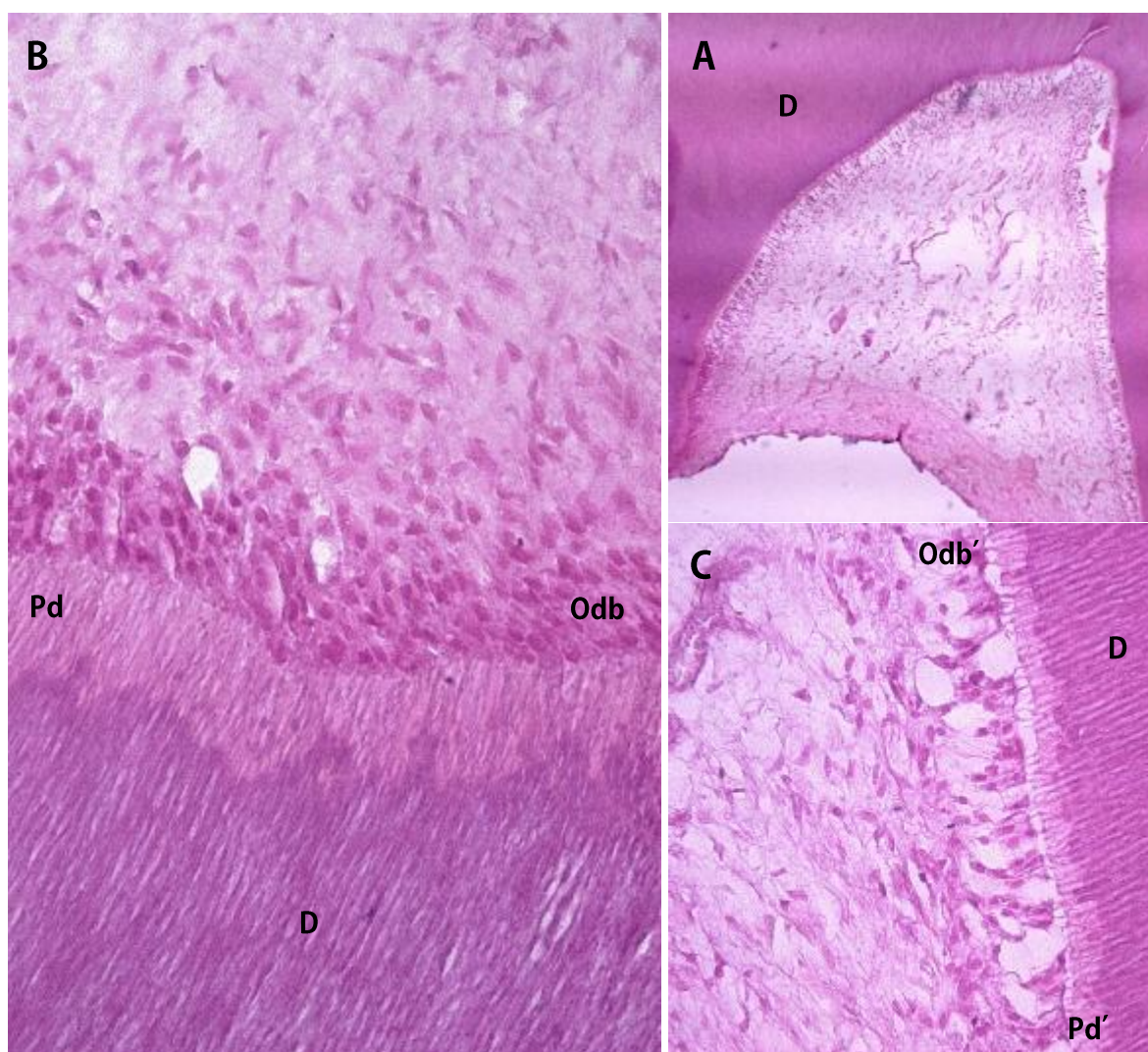


Figura 23 – (A) Fotomicrografia óptica de corte transversal de dente do grupo +1 dia (Magnificação 40x; Coloração HE). (B) Fotomicrografia óptica de região cervical do mesmo dente (Magnificação 400x; Coloração HE), com Dentina (D), Pré-dentina (Pd) e camada odontoblástica (Odb). (C) Fotomicrografia óptica de região do corno pulpar do mesmo dente (Magnificação 400x; Coloração HE), com Dentina (D), Pré-dentina menos espessa (Pd') e camada odontoblástica menos densa e com prolongamentos odontoblásticos visíveis (Odb').

2.2.5 Grupo +4 dias

A figura 24 representa os tecidos pulpo-dentinários de um dente do grupo +4 dias. Observa-se a dentina circumpulpar. O tecido pulpar evidencia uma arquitetura aparentemente normal. Por um lado, observamos numa das regiões uma camada odontoblástica com sinais de apoptose e lise celular, atípica e afastada da dentina secundária, com ausência de pré-dentina (Fig. 24 B). Por outro lado, observamos uma zona com uma camada odontoblástica afastada de uma região que a separa da dentina, podendo corresponder a resquícios de pré-dentina.

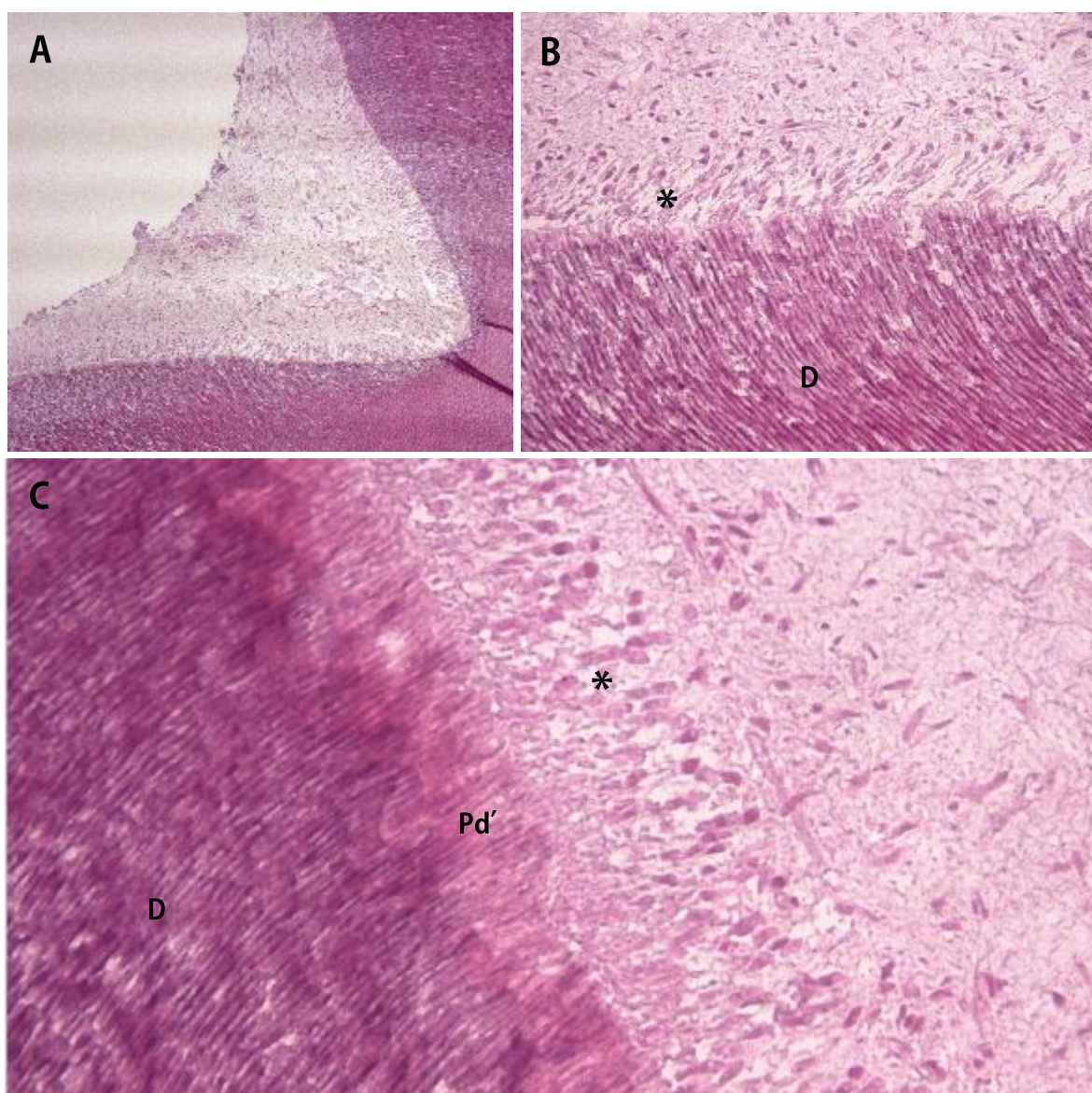


Figura 24 – (A) Fotomicrografia óptica de corte transversal de dente do grupo +4 dias (Magnificação 100x; Coloração HE). (B) Fotomicrografia óptica mesmo dente (Magnificação 400x; Coloração HE), com Dentina (D), e camada odontoblástica alterada com sinais de lise celular (*). (C) Fotomicrografia óptica de região mais coronal do mesmo dente (Magnificação 400x; Coloração HE), e observa-se vestígios de pré-dentina (Pd') bastante heterogênea.

2.2.6 Grupo +7 dias

A figura 25 representa os tecidos pulpo-dentinários de um dente do grupo +7 dias. O tecido pulpar evidencia uma arquitetura aparentemente normal. Observamos dentina circumpulpar, pré-dentina e uma camada odontoblástica pseudo-estratificada espessa, de morfologia fusiforme, semelhante à observada no controlo positivo (Fig. 18) e +1 dia (Fig. 23). Podemos observar também uma orientação diferente dos túbulos dentinários, no sentido longitudinal (Fig. 21B)

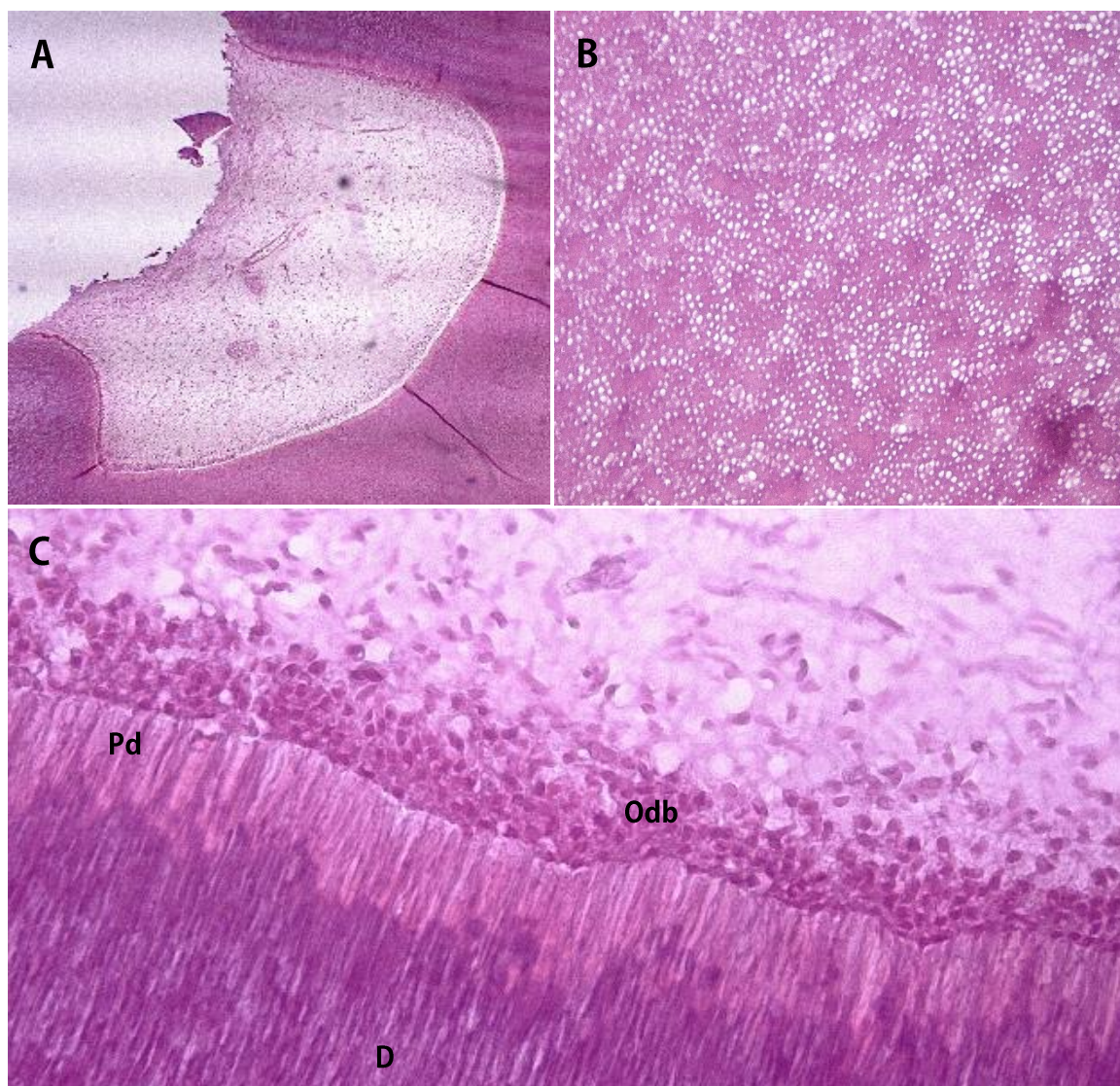


Figura 25 – (A) Fotomicrografia óptica de corte transversal de dente do grupo +7 dias (Magnificação 100x; Coloração HE). (B) Fotomicrografia óptica mesmo dente (Magnificação 400x; Coloração HE), de uma região de túbulos dentinários com uma orientação diferente. (C) Fotomicrografia óptica de região mais cervical do mesmo dente (Magnificação 400x; Coloração HE) com dentina secundária (D), pré-dentina (Pd) e camada odontoblástica (Odb).

V. Discussão

As células humanas primárias recriam as circunstâncias fisiológicas das condições *in vivo* e produzem dados mais relevantes dos sistemas vivos.

O estudo de células *in vitro* fornece um método de estudo num ambiente controlado. No entanto, como afirmam Ratner, Hoffman, Schoen, & Lemons (2012) “os sistemas *in vitro* não conseguem recriar a complexidade da biologia *in vivo*”, “têm a dificuldade de recriar a tridimensionalidade ambiental e a sinalização temporal e espacial”. Assim, torna-se difícil concluir com certeza as respostas celulares observadas em inúmeros estudos *in vitro*.

Atualmente, enfrentamos a mesma dificuldade quando tentamos estudar as respostas pulpares e, mais concretamente, a dinâmica dos odontoblastos. Estas células, como já descrito anteriormente, são um caso muito peculiar porque estão envolvidas por tecidos mineralizados (esmalte, dentina e cimento) e que dificultam o seu acesso e observação.

Em relação a este estudo, o método testado é um método de cultura *in situ ex vivo*, isto é, é um método de cultura de células e tecidos primários no seu meio natural (o dente) e fora do organismo que, com a aplicação de um soro de cultura celular, possa manter as suas características histomorfológicas num intervalo de tempo.

Análise da metodologia empregue

Inicialmente, pretendíamos usar primeiros pré-molares para o estudo (Salles Scheffel *et al.*, 2015) mas, devido à escassez, optámos por terceiros molares (Couve, Osorio, & Schmachtenberg, 2014; Gronthos *et al.*, 2002; Sabatini *et al.*, 2014; Tjaderhane *et al.*, 1998) porque são os dentes hígidos exodonciados com mais frequência na Clínica Universitária Egas Moniz, por motivos ortodônticos.

Uma vantagem da utilização de terceiros molares é o facto de a polpa ser 2 a 3 vezes maior que a polpa dos pré-molares (Kumar, 2011). Contrariamente, uma limitação é a grande variabilidade anatómica pulpar dos sisos. Este aspeto revelou-se importante porque, em alguns dentes, o teto da câmara pulpar coincidiu com o nível da junção amelocementária, diminuindo a área pulpar disponível. Pelo que, para obtermos uma maior área de polpa, recomendamos que o corte horizontal seja efetuado abaixo da junção amelocementária.

Para que os tecidos pulpaes continuassem a ser nutridos, após a extração, foi indispensável efetuar um corte longitudinal ao nível da junção amelocementária, para expor o tecido pulpar (Tjaderhane *et al.*, 1998; Tjäderhane *et al.*, 2001; Daud *et al.*, 2014; Ricucci, Loghin, Lin, Spångberg, & Tay, 2014). A coroa ficou virada para baixo, expondo a polpa e facilitando o contacto com o meio de cultura e com o formol. Assim, sendo a polpa um tecido altamente permeável e os odontoblastos ricos em junções especializadas (tabela 1), testámos se a utilização de um soro de cultura seria capaz de manter a hidratação e difundir nutrientes pelos tecidos. Também devemos considerar o efeito da gravidade como um fator relevante na difusão do soro.

O meio de cultura utilizado foi o DMEM, pela sua alta concentração de glucose e L-Glutamina. Para além disso, na tentativa de impedir a contaminação bacteriana e fúngica durante a cultura em estufa, suplementámos o soro com penicilina/estreptomicina e fungizona.

Opostamente, pretendeu-se sujeitar os dentes a condições extremas e observar essas alterações histomorfológicas. Por um lado, colocámos em soro fisiológico, que apesar de isotónico, não tem nutrientes nem aminoácidos e, em segundo, sem qualquer meio para observar a reação pulpo-dentinária num meio de extrema secura.

Relativamente à estufa utilizada, a única limitação apresentada prende-se com o facto de não ser com CO₂ controlado. Por outro lado, para minimizar a contaminação durante a manipulação dos soros, antes e depois da abertura da estufa, efectuou-se esterilização com álcool a 70% e utilizou-se materiais descartáveis.

Os cortes foram realizados com instrumentos rotatórios manuais. Os nossos resultados histológicos estão em conformidade com alguns autores (Murray *et al.*, 2000; Emeth, Rman, & Artinè, 2006), isto é, o corte exercido (com mínima pressão, utilizando brocas novas e com irrigação constante) minimizou os efeitos ao nível da polpa, afectando apenas algumas zonas próximas do corte. Na maioria dos casos, a arquitetura pulpar pareceu manter-se totalmente intacta.

Durante o corte dos dentes experienciámos alguns obstáculos no corte longitudinal, pois houve a permanência de remanescentes de esmalte, sobretudo em oclusal. Consequentemente, a dureza destes remanescentes pode resultar em ressaltos durante o corte manual, tornando estas superfícies irregulares para o processamento em micrótomo. Assim, durante a observação de algumas lâminas constatou-se que existiam diferenças na orientação dos túbulos dentinários e dos tecidos pulpaes, resultado da irregularidade da peça histológica (Figura 21B). Assim, para

obtermos um corte mais preciso e facilitado, recomendamos a utilização de instrumentos mecânicos de corte.

A descalcificação de osso e dentes é um passo essencial no processamento de tecidos. Como afirma Sanjai *et al.* (2012), “a velocidade de descalcificação e o efeito dos agentes descalcificantes nos tecidos e suas características de coloração” são dois parâmetros fundamentais para a escolha do descalcificante.

Tendo em consideração este aspeto, tornou-se essencial definir o descalcificante que apresentava uma velocidade de descalcificação rápida e que mantivesse a integridade dos tecidos pulpare. Por este motivo, consumámos testes-piloto de descalcificação com peças dentárias, que foram colocadas em Ácido Nítrico (5%) e EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) (5%). Em relação à descalcificação em ácido nítrico, o processo de descalcificação foi rápido, no entanto a preservação da integridade dos tecidos pulpare não preencheu os requisitos (Figura 13). Relativamente à descalcificação com EDTA, o processo foi muito lento, mesmo com tentativas de aceleração com ultrassons (Sanjai *et al.* 2012), pelo que não se dispunha do tempo necessário para que a descalcificação com EDTA findasse.

Desta forma, optámos por efetuar a descalcificação com ácido tricloroacético (5%) que, segundo Sanjai *et al.* (2012), apresenta:

- Maior velocidade de descalcificação em relação ao EDTA e menor velocidade que o ácido nítrico;
- Maior capacidade de preservação dos tecidos pulpare que o ácido nítrico e menor que o EDTA.

Procedemos à descalcificação durante 45 dias, com troca semanal da solução (Sanjai *et al.*, 2012). Contudo, após os 45 dias recomendados, todos os dentes apresentavam uma grande espessura de esmalte oclusal, que impediu a descalcificação desta zona. Na tentativa de ultrapassar este problema, colocámos os dentes na mesma solução em estufa a 45°C. Mesmo assim, a descalcificação em oclusal não finalizou. Pesquisámos na literatura alternativas para ultrapassar este problema, mas não encontrámos bibliografia sobre esta matéria.

Desenvolvemos um método alternativo para remover o esmalte oclusal. Emergimos cada dente em Biodec, até onde apresentava esmalte. Durante 10 dias, controlámos a descalcificação, com limpezas diárias dos remanescentes cálcicos. Após esse tempo, os dentes foram colocados novamente em ácido tricloroacético para uniformizar a descalcificação. Constatámos que este método acelerou a descalcificação das peças sem comprometer a viabilidade dos tecidos moles.

Assim, os nossos resultados de descalcificação levam-nos a discordar dos tempos propostos por Sanjai *et al.* (2012). Em estudos futuros, é fundamental iniciarmos o procedimento de descalcificação pela remoção de esmalte com um descalcificador rápido, protegendo a polpa durante esse procedimento e, de seguida, finalizarmos com um descalcificador lento, para obtermos uma uniformização do processo.

Análise histomorfológica

Segundo Linde e Goldberg (1993) “a pré-dentina é uma característica constante em dentes saudáveis”. Quando observamos a presença de pré-dentina, estamos perante uma camada odontoblástica funcional subjacente, já que é a responsável pela sua produção (Linde & Lundgren, 1995; Goldberg, Kulkarni, Young, & Boskey, 2012).

Nos dentes do grupo 0 (controlo positivo) era expectável a presença de pré-dentina, característica que se observou, estando em concordância com os estudos de Linde e Goldberg (1993).

Contrariamente, nos grupos de controlo negativo (SF e SM) não se observou a presença de pré-dentina, facto compreensível e expectável, em nossa opinião, já que os dentes foram sujeitos a condições propícias a causar a astenia e colapso dos tecidos pulpaes.

Relativamente aos grupos de cultura com soro DMEM em estufa (+1, +4 e +7 dias), verificou-se a presença de pré-dentina, acompanhado de características celulares e morfológicas condizentes com uma polpa aparentemente normal ou com mínimas alterações, quando comparada com o grupo de controlo positivo. Assim, relativamente à hipótese do soro utilizado ter capacidade para suportar os tecidos pulpaes *in situ ex vivo* em estufa, é plausível inferir que o contacto com a polpa permitiu, aparentemente, a conservação de uma histomorfologia semelhante à do grupo de controlo positivo.

No entanto, apesar dos resultados promissores, é fundamental uma otimização dos procedimentos de corte e da técnica de descalcificação de forma a podermos uniformizar os resultados histológicos.

VI. Conclusões

O dente, suplementado com soro de cultura celular e incubado em estufa controlada, pode ser um método orgânico promissor de cultura *in situ* de odontoblastos.

Assim, rejeitamos a hipótese nula já que não encontramos diferenças histomorfológicas da polpa dos grupos de cultura com DMEM (+1, +4 e +7 dias) em comparação com o grupo de controlo positivo.

Concluimos também que é necessária uma otimização do corte e do procedimento de descalcificação para se obter uma homogeneização dos resultados histológicos em estudos futuros.

Perspectivas futuras

No futuro pretendemos:

- ▶ Optimizar o procedimento de corte;
- ▶ Optimizar o processo de descalcificação;
- ▶ Estudar e caracterizar o tecido pulpar para melhorarmos a suplementação do soro de cultura celular.

VII. Referências Bibliográficas

- Arana-Chavez, V., & Katchburian, E. (1997). Development of Tight Junctions Between Odontoblasts in Early Dentinogenesis as Revealed by Freeze-Fracture, 338(January), 332–338.
- Arana-Chavez, V., & Massa, L. F. (2004). Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(8), 1367–1373.
- Avery, J. K., & Chiego, D. J. (2006). Essentials of Oral Histology and Embryology A Clinical Approach. (3ª Edição, pp. 97-136). Mosby Elsevier.
- Bjørndal, L., & Thylstrup, A. (1998). A practice-based study on stepwise excavation of deep carious lesions in permanent teeth: a 1-year follow-up study. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 26(10), 122–128.
- Bleicher, F. (2013). Odontoblast physiology. *Experimental Cell Research*, 325(2), 65–71.
- Brännström, M., & Lind, P. O. (1965). Pulpal response to early dental caries. *Journal of Dental Research*, 44, 1045–1050.
- Carda, C., & Peydró, A. (2006). Ultrastructural patterns of human dentinal tubules, odontoblasts processes and nerve fibres. *Tissue and Cell*, 38, 141–150.
- Cavacas, M. A. (2014). Alterações morfológicas dentárias provocadas pelo ruído industrial. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade do Porto.
- Cavacas, M. A., Tavares, V., Borrecho, G., Oliveira, M. J., Oliveira, P., Águas, A., & Dos Santos, J. M. (2015). Industrial Noise and Tooth Wear – Experimental Study, 12(3), 3–8.
- Cavacas, M. A., Tavares, V., Oliveira, M. J., Oliveira, P., Sezinando, A., & Dos Santos, J. M. (2013). Effects of industrial noise on circumpulpal dentin - A field emission scanning electron microscopy and energy dispersive spectroscopy analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 6(12), 2697–2702.
- Couve, E. (1986). Changes During the Life Cycle of Human Odontoblasts. *Archives of Oral Biology*, 31(10), 643–651.
- Couve, E., Osorio, R., & Schmachtenberg, O. (2012). Mitochondrial Autophagy and Lipofuscin Accumulation in Aging Odontoblasts. *Journal of Dental Research*, 91, 696–701.
- Couve, E., Osorio, R., & Schmachtenberg, O. (2013). The amazing odontoblast: activity, autophagy, and aging. *Journal of Dental Research*, 92(9), 765–772.
- Couve, E., Osorio, R., & Schmachtenberg, O. (2014). Reactionary Dentinogenesis and Neuroimmune Response in Dental Caries. *Journal of Dental Research*, 93(8), 788–793.

- Daud, S., Nambiar, P., Hossain, M. Z., Rahman, M. R. A., & Bakri, M. M. (2014). Changes in cell density and morphology of selected cells of the ageing human dental pulp. *Gerodontology*, 1–7.
- Emeth, L. N., Rman, A. E., & Artinèiè, D. Š. T. (2006). Early Odontoblastic Layer Response to Cavity Preparation and Acid Etching in Rats, 54(1).
- Farges, J.-C., Keller, J.-F., Carrouel, F., Durand, S. H., Romeas, A., Bleicher, F., Lebeque, S., Staquet, M.-J. (2008). Odontoblasts in the dental pulp immune response. *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution*, 312B(5), 425–436.
- Fejerskov, O., & Kidd, E. (2008). Dental Caries: The Disease and its Clinical Management (2^a Edição, pp. 367–373). Blackwell Munksgaard.
- Ferraris, M., & Muñoz, A. (2006). Histología y Embriología bucodental. (2^a Edição, pp. 209–316). Editorial Medica Panamericana.
- Goldberg, M., Kulkarni, A. B., Young, M., & Boskey, A. (2012). Dentin: Structure, Composition and Mineralization: The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization. *Frontiers in Bioscience*, 3, 711–735.
- Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P. G., Shi, S. (2002). Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *Journal of Dental Research*, 81(8), 531–535.
- Hargreaves, K. M., & Cohen, S. (2011). Cohen's Pathways of the Pulp (10^a Edição, pp. 504–524). Mosby Elsevier.
- Heyeraas, K. J., & Berggreen, E. (1999). Interstitial Fluid Pressure in Normal and Inflamed Pulp. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 10(3), 328–336.
- Jontell, M., Okiji, T., Dahlgren, U., & Bergenholtz, G. (1998). Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 9(2), 179–200.
- Kumar, G. S. (2011). Orban's Oral Histology and Embryology (13^a Edição, pp. 50–150). Elsevier.
- Linde, A., & Goldberg, M. (1993). Dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*.
- Linde, A., & Lundgren, T. E. D. (1995). From serum to the mineral phase. The role of the odontoblast in calcium transport and mineral formation. *The International Journal of Developmental Biology*, 222, 213–222.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., Scott, M. (2013). Molecular Cell Biology (7^a Edição, pp. 936–937). New York: W. H. Freeman and Company.

- Magloire, H., Bouvier, M., & Joffre, A. (1992). Odontoblast response under carious lesions. *Proceedings of the Finnish Dental Society*, 1(88), 257–274.
- Magloire, H., Couble, M. L., Romeas, A., & Bleicher, F. (2004). Odontoblast primary cilia: Facts and hypotheses. *Cell Biology International*, 28, 93–99.
- Magloire, H., Couble, M.-L., Thivichon-Prince, B., Maurin, J.-C., & Bleicher, F. (2009). Odontoblast: a mechano-sensory cell. *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution*, 312B(5), 416–424.
- Murray, P. E., About, I., Lumley, P. J., Franquin, J. C., Remusat, M., & Smith, A. J. (2000). Human odontoblast cell numbers after dental injury. *Journal of Dentistry*, 28, 277–285.
- Murray, P. E., Stanley, H. R., Matthews, J. B., Sloan, A. J., & Smith, A. J. (2002). Age-related odontometric changes of human teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 93, 474–482.
- Nanci, A. (2012). Ten Cate's Oral Histology Development, Structure, and Function. (8ª Edição, pp. 122-204). Elsevier Mosby.
- Oehmke, M. J., Knolle, E., & Oehmke, H.-J. (2003). Lymph drainage in the human dental pulp. *Microscopy Research and Technique*, 62(3), 187–191.
- Ohshima, H. (1990). Ultrastructural changes in odontoblasts and pulp capillaries following cavity preparation in rat molars. *Archives of Histology and Cytology*, 53(4), 423–438.
- Pashley, D. H. (1996). Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 7(2), 104–133.
- Perdigão, J. (2010). Dentin bonding-Variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dental Materials*, 26(1996), 24–37.
- Perdigão, J., Reis, A., & Loguercio, A. D. (2013). Dentin adhesion and MMPs: A comprehensive review. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 25, 219–241.
- Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, J. F., & Lemons, J. E. (2012). Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine (3ª Edição, p. e1). Academic Press.
- Ricucci, D., Loghin, S., Lin, L. M., Spångberg, L. S. W., & Tay, F. R. (2014). Is hard tissue formation in the dental pulp after the death of the primary odontoblasts a regenerative or a reparative process? *Journal of Dentistry*, 42(9), 1156–1170.
- Rouvière, H., & Delmas, A. (2005). *Anatomía Humana - Tomo 1 Cabeza Y Cuello* (11ª Edição, pp. 463-468). Elsevier Masson.
- Ruch, J. V., Lesot, H., & Begue-kirn, C. (1995). Odontoblast Differentiation. *International Journal of Developmental Biology*, 68, 51–68.
- Sabatini, C., Scheffel, D. L. S., Scheffel, R. H., Agee, K. A., Rouch, K., Takahashi, M., Breschi, L., Mazzoni, A., Tjäderhane L., Tay, F. R., Pashley, D. H. (2014). Inhibition of

- endogenous human dentin MMPs by Gluma. *Dental Materials : Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 30(7), 752–758.
- Salles Scheffel, D. L., Sacono, N. T., Dias Ribeiro, A. P., Soares, D. G., Basso, F. G., Pashley, D., De Souza Costa, C. A., Hebling, J. (2015). Immediate human pulp response to ethanol-wet bonding technique. *Journal of Dentistry*, 43(5), 537–545.
- Sanjai, K., Kumarswamy, J., Patil, A., Papaiah, L., Jayaram, S., & Krishnan, L. (2012). Evaluation and comparison of decalcification agents on the human teeth. *J Oral Maxillofac Pathol*, 16, 222–227.
- Sasaki, T., & Garant, P. R. (1996). Structure and organization of odontoblasts. *Anatomical Record*, 245(2), 235–249.
- Smith, A. J., Cassidy, N., Perry, H., Begue-Kirn, C., Ruch, J. V., & Lesot, H. (1995). Reactionary dentinogenesis. *International Journal of Developmental Biology*, 39(1), 273–280.
- Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2004). Resin bonding to cervical sclerotic dentin: a review. *Journal of Dentistry*, 32(3), 173–196.
- Thivichon-Prince, B., Couble, M. L., Giamarchi, A., Delmas, P., Franco, B., Romio, L., Struys, T., Lambrechts, I., Ressenkoff, D., Magloire, H., Bleicher, F. (2009). Primary cilia of odontoblasts: possible role in molar morphogenesis. *Journal of Dental Research*, 88, 910–915.
- Tjäderhane, L., Koivumäki, S., Pääkkönen, V., Ilvesaro, J., Soini, Y., Salo, T., Metsikkö, K., Tuukkanen, J. (2013). Polarity of mature human odontoblasts. *Journal of Dental Research*, 92(11), 1011–1016.
- Tjäderhane, L., Palosaari, H., Wahlgren, J., Larmas, M., Sorsa, T., & Salo, T. (2001). Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs). *Advances in Dental Research*, 15, 55–58.
- Tjäderhane, L., Salo, T., Larjava, H., Larmas, M., & Overall, C. M. (1998). A Novel Organ Culture Method to Study the Function of Human Odontoblasts in vitro: Gelatinase Expression by Odontoblasts is Differentially Regulated by TGF- 1. *Journal of Dental Research*, 77(7), 1486–1496.
- Tziafas, D. (1995). Basic mechanisms of cytodifferentiation and during dental pulp repair. *International Journal of Developmental Biology*, 39, 281–290.

VIII. Anexos



15

Ex.mo Senhor
João Tiago da Silva Botelho

Monte de Caparica, 29 de janeiro de 2015

Ex.mo Senhor,

Venho comunicar-lhe que o Pedido de Parecer que submeteu à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz, com o tema denominado "*O dente como método orgânico de cultura in situ de odontoblastos: avaliação histomorfológica*", foi aprovado por unanimidade.

Com os melhores cumprimentos,

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz

Profª. Doutora Maria Fernanda de Mesquita

c.c. – Profª. Doutora Maria Alzira Cavacas

CONSENTIMENTO INFORMADO PARA EXODONTIA

Eu, _____, portador do
B.I. / C.C. nº _____, do Arquivo _____, data
_____, após ter recebido informações que me foram transmitidas
durante a elaboração do diagnóstico clínico e radiográfico e não tendo condição de
receber tratamento conservador e consequente permanência na cavidade oral por
_____ (motivo da exodontia), **consinto**
na realização da(s) exodontia(s) do(s) dente(s) _____,
bem como a respectiva **Doação dos Órgãos em Questão ao Banco de Dentes Humanos**
do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, a fim de posterior utilização,
sem fins lucrativos, em pesquisa científica e ensino, preservando a minha identidade.

_____, de _____ de _____

Assinatura do doente, _____

Assinatura do responsável pela recolha, _____